

SÉRIE A, N° 1842

N° D'ORDRE :

2709

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

B. DELAGE

Licencié ès sciences physiques

Licencié ès sciences naturelles

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur du Maroc

1^{re} THÈSE. — LE SYSTÈME LIPOPROTEIDIQUE DU SÉRUM SANGUIN.

2^{me} THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

12 JAN. 1939

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

MM. M. JAVILLIER *Président*

R. LÉVY

R. WURMSER

} *Examineurs*

SÉRIE A, N° 1842

N° D'ORDRE :

2709

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

B. DELAGE

Licencié ès sciences physiques

Licencié ès sciences naturelles

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur du Maroc

1^{re} THÈSE. — LE SYSTÈME LIPOPROTEIDIQUE DU SÉRUM SANGUIN.

2^{me} THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

MM. M. JAVILLIER *Président*

R. LÉVY

R. WURMSER

} *Examinateurs*

FACULTÉ DE SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS.

MM.

Doyen honoraire... M. MOLLARD.

Doyen... C. MAURAIN, Professeur, Physique du Globe

Professeurs honoraires...

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

H. LEBESGUE.
A. FERNBACH.
Emile PICARD.
Léon BRILLOUIN.
GUILLET.
PECHARD.
FREUNDLER.
AUGER.

BLAISE.
DANGEARD.
LESPIEAU.
MARCHIS.
VESSIOT.
PORTIER.
MOLLIARD.
LAPICQUE.

G. BERTRAND.
ABRAHAM.
Ch. FABRY.
Léon BERTRAND.
WINTREBERT.
DUBOSQ.
BOHN.
RABAUD.

PROFESSEURS

M. CAULLERY T Zoologie (Evolution des êtres organisés).
M. GUICHARD Chimie générale.
Emile BOREL T Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Jean PERRIN T Chimie physique.
E. CARTAN T Géométrie supérieure.
A. COTTON T Recherches physiques.
J. DRACH T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
Charles PEREZ T Zoologie.
M. GUICHARD Analyse et mesures chimiques.
Paul MONTEL T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.
L. BLARINGHEM T Botanique.
G. JULIA T Mécanique analytique et Mécanique céleste.
C. MAUGUIN T Minéralogie.
A. MICHEL-LEVY T Pétrographie.
H. BENARD T Mécanique expérimentale des fluides.
A. DENJOY T Application de l'analyse à la Géométrie.
L. LUTAUD T Géographie physique et géologie dynamique.
Eugène BLOCH T Physique.
G. BRUHAT Physique.
E. DARMOIS T Enseignement de Physique.
A. DEBIERNE T Physique générale et Radio-activité.
A. DUFOUR T Physique (P. C. B.).
L. DUNOYER Optique appliquée.
A. GUILLIERMOND T Botanique.
M. JAVILLIER T Chimie biologique.
ROBERT-LEVY T Physiologie comparée.
F. PICARD Zoologie (Evolution des êtres organisés).
Henri VILLAT T Mécanique des fluides et applications.
Ch. JACOB T Géologie.
P. PASCAL T Chimie minérale.
M. FRECHET T Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. ESCLANGON T Astronomie.
M^{me} RAMART-LUCAS T Chimie organique.

H. BEGHIN T Mécanique physique et expérimentale.
FOCH Mécanique expérimentale des fluides.
PAUTHENIER Physique (P. C. B.).
DE BROGLIE T Théories physiques.
CHRETIEN Optique appliquée.
P. JOB Chimie générale.
LABROUSTE Physique du Globe.
PRENANT T Anatomie et Histologie comparées.
VILLEY Mécanique physique et expérimentale.
COMBES T Physiologie végétale.
GARNIER T Mathématiques générales.
PERES Mécanique théorique des fluides.
HACKSPILL Chimie (P. C. B.).
LAUGIER T Physiologie générale.
TOUSSAINT Technique Aéronautique.
M. CURIE Physique (P. C. B.).
G. RIBAUD T Hautes températures.
CHAZY T Mécanique rationnelle.
GAULT Chimie (P. C. B.).
CROZE Recherches Physiques.
DUPONT T Théories chimiques.
LANQUINE T Géologie structurale et Géologie appliquée.
VALIRON Mathématiques générales.
BARRABE Géologie structurale et géologie appliquée.
MILLOT Biologie animale (P. C. B.).
F. PERRIN Théories physiques.
VAVON Chimie organique.
G. DARMOIS Calcul des probabilités Physique-Mathématique.
CHATTON T Biologie maritime.
AUBEL Chimie biologique.
Jacques BOURCART Géographie physique et géologie dynamique.
M^{me} JOLIOT-CURIE Physique générale et expérimentale.
PLANTEFOL Biologie végétale (P. C. B.).
CABANNES Enseignement de Physique.
GRASSE Biologie animale (P. C. B.).
REVOST Chimie (P. C. B.).
BOULIGAND Mathématiques.

Secrétaire... A. PACAUD.
Secrétaire honoraire... D. TOMBECK.

A la mémoire de mon grand-père
le Docteur Yves DELAGE

Membre de l'Institut
Professeur à la Sorbonne

A la mémoire de mon père.

A ma mère

Digitized by the Internet Archive
in 2026

A Monsieur le Docteur G. BLANC

Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur du Maroc

A Monsieur le Docteur M. A. MACHEBŒUF
Professeur à la Faculté de Médecine de Bordeaux

C'est en 1931-1932, au laboratoire de Chimiothérapie de la Tuberculose à l'Institut Pasteur que je me suis initié, sous la direction de M. le Docteur MACHEBŒUF, au problème de l'état des lipides dans la matière vivante. M. le Docteur MACHEBŒUF, devenu Professeur à la Faculté de Médecine de Bordeaux, continua à s'intéresser à mes recherches. Ses conseils ne me firent jamais défaut et je lui exprime ici toute ma reconnaissance:

A. CALMETTE me témoigna toujours un bienveillant intérêt et je tiens à rendre à sa mémoire un hommage respectueux.

Il m'est agréable de dire tout ce que je dois à mon ami G. SANDOR, Docteur ès sciences, Docteur en médecine. J'ai retiré de ma trop brève collaboration avec lui, les plus précieux enseignements.

C'est à mon arrivée au Maroc en 1932 que j'ai commencé ce travail. Je désire exprimer toute ma gratitude à M. le Docteur G. BLANC, Membre correspondant de l'Académie de Médecine, Directeur de l'Institut Pasteur du Maroc, qui m'a fait bénéficier de sa parfaite connaissance des problèmes immunologiques auxquels je me suis intéressé et m'a donné toutes facilités pour mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier ici MM: les Docteurs-Vétérinaires H. VELU, Membre correspondant de l'Académie de Médecine, ancien Directeur du Laboratoire du Service de l'Elevage du Maroc, G. ZOTNER, Directeur de ce Laboratoire, IPOUSTÉGUY, Directeur des Abattoirs municipaux, WEYLAND, Chef du Service vétérinaire de la Subdivision de Casablanca, et mon collègue et ami L.-A. MARTIN, Chef du Laboratoire vétérinaire de l'Institut Pasteur du Maroc, qui m'ont fourni la plupart des sérums que j'ai étudiés, ainsi que des précisions sur les animaux malades. Bon nombre d'opérations analytiques ont été effectuées par Mlle L. MONOD, préparatrice à l'Institut Pasteur du Maroc, dont l'aide m'a été fort utile.

M. le Professeur M. JAVILLIER, Membre de l'Institut, Professeur à la Sorbonne et au Conservatoire national des Arts et Métiers, dont l'enseignement de Chimie biologique n'a pas été sans influencer sur mon orientation actuelle, a bien voulu accepter de présider la Commission d'Examen. Je lui exprime mes remerciements respectueux ainsi qu'à M. R. LÉVY, Professeur à la Sorbonne et M. R. WURMSER, Directeur du Laboratoire de Biophysique, à l'Ecole des Hautes Etudes, qui ont bien voulu s'intéresser à ce travail et accepter de siéger dans mon jury de Thèse.

LE SYSTÈME LIPOPROTÉIDIQUE
DU SÉRUM SANGUIN

par B. DELAGE



INTRODUCTION

La stabilité et la mobilité sont, malgré leur apparence contradictoire, deux propriétés fondamentales de la matière vivante.

La plupart des cellules et des tissus conservent pendant des intervalles de temps notables une forme, une structure et une composition assez constantes. Le protoplasme qui les constitue est cependant le siège d'une incessante agitation. Mais, entre les processus antagonistes de synthèse et de dégradation, s'établit un équilibre statistique qui n'est d'ailleurs qu'approximatif. La résultante de toutes ces actions imprime à la matière vivante une évolution insensible, variable et irréversible, le vieillissement.

La lenteur des transformations, leur enchaînement, le passage à de nouveaux états d'équilibre par un nombre indéfini de paliers thermodynamiques sont conditionnés par l'existence dans les tissus de composés carbonés formés d'un très grand nombre d'atomes.

Les aptitudes réactionnelles tout à fait particulières de ces grosses molécules sont encore accentuées par leur tendance à s'unir avec d'autres composés organiques ou minéraux à l'état de complexes plus ou moins stables, de masse souvent considérable.

Ceux dont les constituants sont libérés par hydrolyse sont les plus connus et les mieux étudiés. D'autres doivent nous échapper à peu près complètement en raison de leur fragilité extrême, le processus analytique le plus doux suffisant à les altérer ; l'inconnu de la vie leur est lié en partie.

Dans les tissus vivants, lipides et protéides ne sont généralement pas à l'état libre ; ils sont engagés dans des complexes dont les propriétés diffèrent de celles des principes immédiats constitutifs. Cet état dissimulé est surtout manifeste pour les lipides qui sont dissous dans le sérum et ne se laissent pas extraire par leurs solvants habituels.

Nous montrerons que l'on peut distinguer dans le sérum sanguin deux catégories de lipides qui, malgré leur composition chimique très voisine, diffèrent l'une de l'autre par l'intensité des forces qui les unissent aux protéides. Leur étude présente un grand intérêt pratique et théorique.

Au point de vue pratique, il arrive souvent que la lipémie et la protéidémie d'un animal en bonne santé varient de façon irrégulière. Dans certains états pathologiques, par contre, les variations peuvent être divergentes ou insignifiantes. L'expérience nous a montré que l'on peut définir avec beaucoup de certitude un « état de santé » et un « état de maladie grave » d'après les proportions relatives de ces deux catégories de lipides.

Nous espérons que ce test exclusivement physico-chimique de l'état pathologique en général permettra de saisir ce qu'il y a de commun dans toutes les réactions humorales particulières que l'immunologie étudie empiriquement.

Au point de vue théorique, nous établirons les relations qui existent entre les deux catégories de lipides que nous avons considérées et les deux grandes fractions protéidiques du sérum. Nous parviendrons à saisir plus complètement le mécanisme de l'équilibre, mesure d'activités biologiques essentielles, qui s'établit entre les lipides et les protéides dans le système lipoprotéidique du sérum sanguin.

PREMIÈRE PARTIE



TECHNIQUES

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LA PRÉPARATION DU SÉRUM

De tous les constituants de la matière vivante, les plus caractéristiques sont les protéides. Un des buts de ce travail est de montrer que l'intérêt de leur étude est rehaussé si on les considère non comme des principes immédiats, ayant les fonctions que leur donne leur composition chimique, mais comme de véritables systèmes physico-chimiques; on établira leurs relations étroites avec d'autres principes immédiats, en particulier les lipides, et les réactions des uns sur les autres.

Les protéides qui proviennent de la plupart des tissus sont enfermés dans le cadre plus ou moins rigide de la cellule à l'état de gels semi-solides. Dans le plasma et le sérum sanguins au contraire, ils sont en solution ; de là leur intérêt particulier.

Cet exposé préliminaire a pour but de rappeler quelques généralités sur le sérum, de fixer les conditions de sa récolte et de son emploi, et d'indiquer les principales méthodes analytiques utilisées au cours de cette étude.

RAPPORT DU SERUM AVEC LE SANG

Ces notions classiques seront brièvement résumées :

Le sang circulant est constitué par des éléments figurés (hématies, leucocytes, plaquettes) en suspension dans un milieu liquide, le plasma.

Lorsqu'il s'écoule hors d'un vaisseau, le sang se prend plus ou moins rapidement en masse : c'est la coagulation sanguine qui consiste essentiellement en la transformation d'un protéide particulier qui passe de l'état de sol (fibrinogène) à l'état de gel (fibrine). La fibrine, au cours de cette floculation, entraîne les éléments figurés du sang et forme avec eux le caillot.

Bien des théories ont été émises pour rendre compte de ce phénomène. Celle de BORDET et DELANGE [1] est sans doute la plus satisfaisante.

D'après ces auteurs, un protéide thermolabile qui existe dans le plasma circulant, le *prosérozyme*, est activé par des corps étrangers au moment de la saignée, et passe à l'état de *sérozyme* actif. Un phosphatide thermolabile, le *cytozyme* de FULD et SPIRO, mis en liberté aux dépens des plaquettes, se combine au sérozyme en présence d'ions calcium pour donner la *thrombine* qui coagule le fibrinogène.

Le sérum est donc, *grosso modo*, le plasma privé de fibrinogène. Celui-ci ayant tendance à se précipiter, le plasma se prête peu aux manipulations. Tout en étant de structure moins complexe, le sérum est le support de la plupart des propriétés biologiques du plasma circulant. Ce n'est pas un matériel artificiellement obtenu par l'expérimentateur puisqu'il se forme spontanément à partir du tissu liquide dont il provient sans altération d'aucune sorte, chimique, physique ou même mécanique.

MODE D'OBTENTION DU SERUM

On peut obtenir un « plasma stabilisé » en ajoutant au sang certains anions (fluorhydrique, oxalique, citrique) qui, précipitant le cation calcique, empêchent la floculation du fibrinogène.

Mais cette addition d'une substance étrangère au sang entraîne un déséquilibre physico-chimique, en particulier dans la répartition de l'ion chlore entre hématies et plasma. D'après Ch. O. GUILLAUMIN [2] la modification que subit

ainsi le rapport $\frac{\text{Cl globulaire}}{\text{Cl plasmatique}}$ est de l'ordre de 2 à 11 %. HIGOUNET [3] retrouve ces résultats et propose l'emploi d'un anticoagulant type anti ferment : l'anéthol disulfonate de soude polymérisé.

Les anticoagulants modifient aussi l'équilibre lipidique entre hématies et plasma (BOYD et MURRAY) [4].

Il semble donc rationnel d'étudier le sérum plutôt qu'un plasma adultéré par l'addition de substances étrangères. La défibrination est un procédé peu pratique pour l'obtention de quantités importantes de sérum. Celui-ci a toujours été obtenu par coagulation spontanée du sang.

CONDITIONS DE PRELEVEMENT DU SANG

1. — *Moment du prélèvement.*

Le sang n'est comparable à lui-même qu'en dehors des périodes digestives ; de nombreux travaux l'ont établi.

M. LAUDAT [5] a montré qu'après l'absorption d'un repas comprenant 50 grammes de beurre, la lipidémie passait de 5-6 à 8-10 grs.

Mme P. JUNG et R. WOLFF [6] ont étudié les variations très considérables que présente le sérum de chien au cours de la période digestive ; excès de P lipoïdique à la suite d'un repas riche en viande, excès d'acides gras à la suite d'un repas de féculents.

2. — *Quantité prélevée.*

BROCQ ROUSSEU [7] a montré que le rendement en sérum augmente du début à la fin de la saignée.

Nous avons fait quelques analyses comparatives pour connaître la composition du sérum au début, au milieu et à la fin de la saignée. Elles permettent d'établir que sa teneur en protéïdes et en lipides diminue au cours de la saignée. L'indice de réfraction varie dans le même sens.

3. — *Séjour du sérum sur le caillot.*

Le temps de contact du sérum sur le caillot influe légèrement sur la composition du sérum. Le sérum conservé 48 heures sur le caillot est moins riche en lipides que le sérum récolté au bout de 24 heures.

Les variations observées sont constantes. Elles ne sont pas très considérables mais nettement en dehors des erreurs expérimentales.

TECHNIQUE EMPLOYÉE POUR LA PRÉPARATION DU SÉRUM

Ces données justifient le mode opératoire que nous avons adopté :

Dans la mesure du possible les animaux reçoivent une nourriture uniforme pendant le cours des expériences.

Ils sont mis à la diète complète et au repos 15 à 16 heures avant la saignée.

Chez les gros animaux, (équidés, bovidés) le sang est prélevé aseptiquement par ponction de la veine jugulaire et récolté dans un vase à saignée stérile ; on laisse tomber la masse de fonte lorsque le caillot est bien formé (une heure après la prise de sang, en général). Chez les petits animaux (rongeurs) le prélèvement est fait par ponction cardiaque.

Pour les séries d'expériences comparatives, on prélève une quantité de sang à peu près uniforme (600 à 700 cc chez les gros animaux). Le sérum est décanté au bout de 24 heures et centrifugé. S'il n'est pas utilisé le jour même, on le conserve à la glacière à une température voisine de $+ 3^{\circ}$.

ÉNONCÉ DE QUELQUES RÉSULTATS

L'étude de la technique d'obtention du sérum nous a permis incidemment d'établir les faits suivants :

a) La teneur en protéides et en lipides diminue du commencement à la fin de la saignée.

b) La teneur en lipides diminue quand le sérum reste en contact avec le caillot.

CHIFFRES EXPÉRIMENTAUX

Protocole de l'expérience I :

Au cours de la saignée, on a recueilli le sang de la façon suivante :

Environ 50 cc dans un premier récipient (I)

Environ 600 cc dans un deuxième récipient (II)

Environ 50 cc dans un troisième récipient (III)

Protéides totaux du sérum :

Dosage sur 2 cc par la méthode de KAYSER.

Dosage par réfractométrie.

Cholestérol :

Dosage par la méthode colorimétrique de GRIGAUT.

Résultats exprimés en gr/litre de sérum.

Δ : Différence entre la composition du sérum au début et à la fin de la saignée rapportée au chiffre moyen

Moment du prélèvement	Génisse 60	Génisse 66			Cheval
	Protéides totaux (Kayser)	Protéides totaux		Cholestérol	Protéides totaux (Kayser)
		Kayser	Réfractométrie		
I	60.2	78.8	79.1	1.50	92.1
II	76.1	76.9	77.6	1.45	91.3
III	75.8	74.6	76.5	1.40	90.6
Δ	5,7 %	5.4 %	3.3 %	7 %	1.6 %

Protocole de l'expérience II :

On prélève à un cheval 4 litres de sang que l'on récolte dans deux vases à saignée I et II : la moitié du sérum de chacun des récipients est séparée du caillot au bout de 24 heures, l'autre moitié au bout de 48 heures. On fait le dosage des lipides totaux.

(Lipides totaux exprimés en mgr. pour 25 cc. de sérum)

	I	II
Sérum 24 h. sur caillot	61,0	57,3
Sérum 48 h. sur caillot	56,5	54,1

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — BORDET (J.) et DELANGE (L.) : La coagulation du sang et la genèse de la thrombine.
Ann. Inst. Pasteur, 1912, 26, 657 et 737.
- 2 — GUILLAUMIN (Ch. O.) : Influence de quelques anticoagulants sur la répartition entre le plasma et les globules des constituants sanguins.
Bull. Soc. Chim. biol., 1930, 12, 491.
- 3 — HIGOUNET (H.) : Influence des anticoagulants sur la répartition des ions Cl- entre le plasma et les hématies.
Bull. Soc. Chim. biol., 1937, 19, 53.
- 4 — BOYD (Eldon M.) et MURRAY (Ronald B.) : The effects of anticoagulants on blood lipids.
The J. biol. Chem., 1937, 117, 629.
- 5 — LAUDAT (M.) : Thèse doct. Pharm. Paris, 1913.
- 6 — JUNG (Mme P.) et WOLFF (R.) : Sur la teneur comparée du plasma et du sérum en lipides.
Bull. Soc. Chim. biol., 1923, 5, 137.
- 7 — BROCC ROUSSEU : Du rendement en sérum à la suite des saignées successives.
C. R. Soc. Biol., 1926, 95, 68.

CHAPITRE II

MÉTHODES ANALYTIQUES

L'exposé des principales méthodes d'analyse utilisées au cours de ce travail ne nous paraît pas superflu. Les techniques de dosage des lipides, en particulier, sont loin d'être classiques et soulèvent encore d'importantes discussions théoriques.

Les auteurs sont à peu près d'accord pour adopter une première lixiviation par l'alcool et une seconde par l'éther dans un appareil à extraction continue du type KUMAGAWA. Les conditions d'évaporation des solvants et de séchage de l'extrait ne sont pas toujours bien fixées.

Certains auteurs opèrent à température aussi basse que possible afin de ne perdre aucune fraction de l'extrait ; d'autres estiment au contraire qu'un chauffage approprié est nécessaire pour éliminer les impuretés volatiles et rendre insolubles dans l'éther des substances résineuses qui ne doivent pas être comptées dans l'extrait lipoïdique.

Nous ne discuterons pas ce problème qui sort des cadres de cette étude. Il semble à cet égard que les sérums des différentes espèces animales ne se comportent pas toujours de façon identique.

La connaissance chimique et le rôle physiologique des substances que nous voulons doser sont souvent insuffisants. C'est pourquoi les méthodes qu'emploie la chimie biologique ne sont pas toujours parfaites. Il importe donc de

ne comparer entre eux que des chiffres obtenus à l'aide d'une même technique dont les différents temps soient très exactement précisés.

Un exemple illustrera mieux ces prescriptions.

Parmi les nombreuses méthodes de dosage du glucose sanguin, celle de BAUDOIN et LEWIN d'une part, celle de FONTES et THIVOLLE d'autre part sont parmi les plus sensibles et les plus fidèles. Or la première donne des résultats systématiquement plus faibles que la deuxième parce que la défécation mercurielle qu'elle utilise élimine une substance réductrice (glucide X de FONTES et THIVOLLE) qui passe dans le filtrat de défécation tungstique. La nature chimique de cette substance est inconnue et son rôle, surtout dans le diabète, mal précisé. La question n'est pas tranchée de savoir si l'on doit doser ce glucide X avec le sucre du sang ou au contraire l'éliminer.

DOSAGE DE L'UREE

Les deux procédés les plus employés pour le dosage de l'urée sont :

La méthode de FOSSE. Le sérum convenablement déféqué est additionné de xanthhydrol qui précipite l'urée à l'état de xanthylurée.

La méthode à l'hypobromite. Ce réactif décompose l'urée en gaz carbonique, qu'on absorbe par la soude, et azote dont on mesure le volume.

En réalité l'azote n'est pas entièrement libéré mais par contre il se dégage un peu d'oxygène. Des expériences témoins permettent de dresser des tableaux de correspondance entre la teneur en urée et le volume gazeux recueilli. Elle donne des résultats supérieurs d'environ 25 % à la méthode de FOSSE, mais de plus, comme l'a montré LAUDAT [1] cet écart n'est pas constant ; il peut tomber à 3 % chez les azotémiques et croît chez certains hépatiques jusqu'à 75 %.

Cette remarque apporte une nouvelle justification aux prescriptions énoncées précédemment.

Technique personnelle

La méthode que nous utilisons est essentiellement celle de FOSSE. La technique de séparation de la xanthylurée nous est personnelle. Nous l'employons depuis plusieurs années déjà avec d'excellents résultats.

L'emploi de papier filtre est peu pratique et peu sûr, la pellicule que l'on détache est fragile et risque de contenir quelques bribes de ce papier. La préparation des filtres d'amiante est assez longue, minutieuse et ne donne de bons résultats qu'avec certaines qualités d'amiante [2].

Avec les filtres à plaque de verre poreux il y a souvent des pertes importantes [3]. Aussi avons-nous été amenés à utiliser des filtres d'Iéna garnis d'amiante.

Voici la technique employée :

Dans un tube à centrifuger de 30 à 50 cc, ajouter volumes égaux de sérum et de réactif de FOSSE (P. ex. 10 cc). Mélanger soigneusement avec une baguette de verre, centrifuger et, s'il y a lieu, filtrer. Au volume prélevé du filtrat, ajouter dans un bécher un égal volume d'acide acétique cristallisable et le dixième environ de ce volume d'une solution à 5 % de xanthidrol dans l'alcool méthylique pur. Attendre deux à trois heures. Au bout de ce temps l'insolubilisation est totale et la filtration se fait très facilement.

Pendant ce temps, on prépare le filtre. Prendre un filtre d'Iéna de porosité G3 de 2 cm, 5 de diamètre sur 10 cm de hauteur ; le garnir d'une petite couche d'amiante en fibres. Laver à l'acide acétique, à l'eau, à l'alcool. Dessécher à 100° (une heure au moins) laisser refroidir une demi-heure dans un exsiccateur à vide puis peser.

Effectuer la filtration de la xanthylurée en s'aidant d'une légère dépression, rincer le bécher à trois reprises avec de petites quantités d'alcool éthylique saturé de xanthylurée en employant un agitateur muni d'un bout de caoutchouc. Dessécher à l'étuve à 100°, laisser refroidir et peser dans les mêmes conditions que pour le filtre vide.

Le poids de xanthylurée exprimé en mgr., divisé par 7 et par la moitié du nombre de cc du filtrat donne la quantité d'urée en gr. par litre de sérum.

DOSAGE DU PHOSPHORE

A. *Phosphore total.*

Nous avons employé la méthode de MACHEBŒUF [4] à quelques détails de technique près.

Dans un matras de KJELDAHL de 30 cc environ introduire 2 cc de sérum et 1 cc d'acide sulfurique concentré ($d = 1.84$). Chauffer jusqu'à apparition de fumées blanches. Après refroidissement ajouter 2 cc d'acide nitrique pur ($d = 1.38$) et porter à l'ébullition. Si la liqueur reste colorée en brun après disparition des vapeurs nitreuses, ajouter encore un peu d'acide nitrique et poursuivre la destruction jusqu'à décoloration complète ou simple persistance d'une légère teinte jaune paille.

Après refroidissement, ajouter 6 cc d'eau et 2 cc de nitrates d'ammonium en solution saturée. Porter au bain marie bouillant pendant 10 minutes environ. Ajouter alors 6 cc de molybdate d'ammonium à 5 % et laisser au bain marie bouillant *pendant 10 minutes exactement*. Laisser refroidir et ajouter 5 cc d'alcool à 95°. Le précipité se rassemble au fond du tube. Jeter le liquide surnageant sur un filtre d'Iéna monté sur fiole à vide. Rincer avec de l'alcool à 50° jusqu'à ce que le filtrat ne précipite plus par addition de chlorure de baryum. La fiole à vide est vidée et rincée.

Dissoudre alors le précipité dans le matras à l'aide de quelques cc d'ammoniaque au quart et jeter ce liquide sur le filtre d'Iéna. Rincer à plusieurs reprises avec de l'eau additionnée d'un peu d'ammoniaque jusqu'à ce que tout le précipité soit dissous.

Transvaser ensuite le contenu de la fiole à vide dans un flacon d'Erlenmeyer de 250 cc environ, ajouter 10 cc de soude $\frac{N}{20}$ et porter à l'ébullition jusqu'à ce que l'ammoniaque soit entièrement chassé (15 à 20 minutes d'ébullition). L'ébullition sera régularisée par l'introduction dans la fiole conique d'une petite cloche capillaire.

Puis ajouter 20 cc d'acide sulfurique $\frac{N}{20}$, porter à nouveau à l'ébullition pendant quelques minutes et titrer à la soude $\frac{N}{20}$ sans laisser refroidir en présence de phénolphtaléine. Après l'apparition du virage, on laisse refroidir quelques minutes et on porte à nouveau à l'ébullition. Le virage disparaît. On ajoute alors la quantité de soude nécessaire pour le faire réapparaître.

Le nombre de cc de soude lu à la burette multiplié par 0,056 donne le poids en mgr. du phosphore de la prise d'essai.

B. *Phosphore lipoidique.*

M. JAVILLIER [5] a montré la nécessité, pour faire des évaluations correctes des différentes formes de phosphore, d'opérer sur des produits stabilisés aussitôt que possible après leur prélèvement. Le mode opératoire que nous avons suivi s'inspire de ces recommandations.

On recueille 20 cc de sang environ dans un flacon de 200 à 250 cc contenant des billes de verre. Après agitation énergique on jette le sang défibriné sur un entonnoir et on centrifuge aussitôt. A l'aide d'une pipette, on prélève 8 à 10 cc de sérum que l'on verse goutte à goutte et en agitant dans un bécher contenant 200 cc d'alcool à 96° pour avoir une matière finement coagulée. On porte à l'ébullition que l'on prolonge pendant une vingtaine de minutes si l'extraction n'est pas effectuée aussitôt.

Les opérations sont ensuite les mêmes que pour le dosage de l'extrait lipoidique total. Le dosage du phosphore dans l'extrait lipoidique ainsi obtenu est fait par la méthode de MACHEBŒUF.

DOSAGE DES LIPIDES

A. — EXTRAIT LIPOÏDIQUE TOTAL :

On verse goutte à goutte le sérum dans l'alcool ; on obtient ainsi un précipité finement coagulé. Celui-ci est porté au bain marie ; quand l'alcool a bouilli quelques minutes, les protéides sont sûrement dénaturés. On filtre alors sur cartouche de DURIEUX (soigneusement dégraissée par une extraction étherée au KUMAGAWA). L'alcool est recueilli et le coagulum épuisé à l'alcool dans l'appareil de KUMAGAWA pendant dix heures et à l'éther pendant trois heures suivant les prescriptions de M. JAVILLIER [6].

On distille les liqueurs alcoolique et étherée dans un ballon à fond rond de un litre en s'aidant du vide. Le résidu est desséché par deux affusions successives d'alcool absolu.

La distillation dans le vide diminue l'altération de l'extrait (et surtout des phosphatides) en abaissant la température à laquelle le solvant est chassé et en permettant d'opérer à l'abri de l'air.

On laisse refroidir sous vide et on reprend par l'éther anhydre sous réfrigérant ascendant à l'ébullition pendant 10 à 15 minutes ; on recommence deux fois cette opération. Les liqueurs étherées sont filtrées dans une fiole tarée, l'éther évaporé et le résidu desséché pendant 8 heures à 50°. On met la fiole à l'exsiccateur à vide et on pèse après une demi-heure.

B. — INSAPONIFIABLE ET ACIDES GRAS TOTAUX :

Cette technique est à quelques détails près celle qui est indiquée par LEMELAND [7].

1) *Saponification* :

A l'extrait lipoidique on ajoute 25 cc de potasse alcoolique 2N et on porte au bain marie bouillant sous réfrigérant ascendant pendant deux heures pour saponifier les lipides.

Le volume est amené à 100 cc, le titre alcoolique à 50° et l'alcalinité à $\frac{N}{10}$ par addition de :

40 cc d'acide chlorhydrique	$\frac{N}{1}$	
26 cc 2 d'alcool à 96°	} 35 cc d'alcool à 89-90°	
8 cc 8 d'eau		

Par un nouveau chauffage à reflux de 20 minutes, on assure la salification totale des acides gras qui ont pu être libérés par adjonction brusque d'acide ; on laisse refroidir.

2) Séparation quantitative de l'insaponifiable total :

On fait passer le contenu du ballon dans une ampoule à décanter de 200 cc. A l'aide d'une éprouvette graduée, on mesure 100 cc d'éther de pétrole léger ($E < 60^\circ$; $0,650 < d < 0,660$) qu'on verse dans un ballon et de celui-ci dans l'ampoule (on évite ainsi l'emploi du liquide de rinçage). Après une forte agitation, on soutire la couche hydro-alcoolique dans le ballon de 1 litre et on verse la couche éthéro-pétrolique par le goulot de l'ampoule dans une autre ampoule à décanter.

On recommence une deuxième fois cette opération avec 50 cc d'éther de pétrole, une troisième fois avec 40 cc, une quatrième fois avec 40 cc.

On lave alors ces 230 cc d'éther de pétrole avec 50 cc d'eau additionnée de quelques gouttes de soude que l'on verse le long des parois sans agiter pour éviter l'émulsion.

3) Séparation des acides gras :

Le liquide contenu dans le ballon de un litre est versé dans un bécher de 250 cc. On y ajoute les 50 cc d'eau de lavage de la solution éthéro-pétrolique en ayant soin d'éviter tout passage de cette solution dans le liquide contenant les acides gras.

On évapore au bain-marie le liquide hydro-alcoolique contenant les acides gras pour chasser l'éther de pétrole et l'alcool. Cette opération est réalisée quand on a évaporé le liquide jusqu'à moitié environ de son volume primitif.

Cette solution alcaline est alors transvasée dans une ampoule de 250 cc, acidifiée nettement (5 cc d'acide chlorhydrique au tiers) et épuisée trois fois par l'éther en suivant la technique qui vient d'être décrite pour l'éther de pétrole.

4) *Dosage de l'insaponifiable total :*

La solution éthéro-pétrolique de l'I. T. (*) est versée dans un ballon à long col et à fond rond de 500 cc et distillée au bain-marie électrique pour chasser le solvant. Dès que le volume est réduit à quelques cc, on branche sur la trompe à vide, le vide étant poussé à son maximum. Les dernières traces d'éther de pétrole sont alors aspirées, on laisse refroidir sous le vide et on reprend par 10 cc d'alcool absolu contenant 10 % de soude $\frac{N}{10}$

On transvase quantitativement dans une fiole de FOURNEAU en rinçant avec quelques cc d'alcool absolu et on évapore au bain-marie bouillant. Dès siccité, on place la fiole dans l'étuve à 50°. On l'enlève au bout de 8 heures et on verse 15 à 20 cc d'éther de pétrole léger ($30^\circ < E < 50^\circ$) dans la fiole encore chaude. Après dissolution, on filtre sur filtre d'amiante dans une fiole de FOURNEAU tarée en rinçant la fiole à trois ou quatre reprises avec de l'éther de pétrole. On laisse évaporer doucement, ce qui se fait très commodément en laissant toute la nuit la fiole couverte d'un papier filtre sur le dessus de l'étuve à 50°. Le lendemain matin, le solvant est évaporé. On place à nouveau une heure dans l'étuve à 50°, on laisse refroidir sous vide dans un exsiccateur à acide sulfurique et on pèse au bout d'une demi-heure.

5) *Dosage des acides gras totaux :*

La solution éthérée des A. G. (*) est transvasée dans un ballon de 500 cc, distillée et séchée dans le vide, on reprend le résidu par l'éther de pétrole léger, on filtre sur amiante dans une fiole de FOURNEAU tarée. L'évaporation, la dessiccation et la pesée sont faites dans les mêmes conditions que pour l'I. T.

(*) I.T. désigne l'insaponifiable total.
A.G. désigne les acides gras totaux.

6) Dosage du cholestérol :

Le cholestérol est dosé par la méthode de WINDAUS modifiée par CAMINADE [8].

On dissout dans la fiole de FOURNEAU même l'I. T. dans la quantité minima de liquide E. A. C. (*) nécessaire pour le dissoudre à l'ébullition.

On ajoute alors quatre à six fois (suivant les cas) son poids de digitonoside dissous dans le liquide E. A. C. et on porte à nouveau au bain-marie jusqu'à commencement d'ébullition.

Après quelques minutes, on jette le précipité sur un filtre d'amiante monté sur fiole à vide. On lave trois fois à l'eau bouillante, ensuite avec quelques cc de mélange E. A. C. et enfin à l'éther. On sèche environ 45 minutes à l'étuve à 100° et on laisse refroidir 30 minutes dans un exsiccateur sous vide en présence d'acide sulfurique dans les mêmes conditions que le filtre vide.

Le poids obtenu multiplié par 0,2431 représente le cholestérol de la prise d'essai.

DOSAGE DES PROTEIDES

A. — PROTEIDES TOTAUX

Il existe de nombreuses méthodes pour doser les protéides totaux du sérum.

1. Réfractométrie :

REISS a montré que l'indice de réfraction du sérum était surtout fonction de sa teneur en protéides. Il a donné un tableau de correspondance entre le chiffre lu au réfractomètre à immersion et le taux albumineux.

(*) La composition du liquide E. A. C. est la suivante :

Eau	18 volumes
Alcool	9 volumes
Acétone	73 volumes

Cette méthode est rapide et commode mais ne donne que des résultats tout à fait approximatifs (GUILLAUMIN, WAHL et LAURENCIN) [9] et d'autant plus inexacts que le sérum est plus riche en lipides. Nous ne l'avons employée qu'à titre indicatif.

2. Azotométrie :

Cette méthode consiste à doser l'azote et à multiplier par l'équivalent azotométrique. Mais celui-ci est assez variable et dépend des proportions de globulines et d'albumines. Nous n'avons pas employé cette méthode.

3. Pesée :

La meilleure méthode est celle qui a été décrite par GRIGAUT, BOUTROUX et CODOUNIS [10] et que nous appliquons ainsi :

Le résidu protéidique délipidé contenu dans la cartouche de l'appareil de KUMAGAWA après les épuisements alcoolique et étheré, est introduit dans un filtre à plaque de verre poreux d'Iéna, lavé à l'eau bouillante jusqu'à ce que celle-ci ne précipite plus par le nitrate d'argent, séché à 100 jusqu'à poids constant et pesé.

Quand on veut simplement doser les protéides sans tenir compte des lipides on peut se servir de la méthode de KAYSER qui donne des protéides moins bien débarrassés de lipides et de sels mais qui convient dans un grand nombre de cas.

Méthode de KAYSER : [11] Dans un vase à précipiter, verser 50 cc d'un mélange à volumes égaux d'alcool et d'acétone. Agiter et verser par petites portions, et en agitant continuellement, 5 cc de sérum sanguin, attendre quelques minutes et filtrer sur un filtre d'Iéna G3. Recueillir les parcelles de précipité qui adhèrent au fond du vase, au moyen de quelques centimètres cubes d'alcool à 95°. Laver deux fois le filtre avec un peu d'alcool. Dessécher le filtre à l'étuve jusqu'à poids constant. Ce poids multiplié par 200 exprime le poids des protéides totaux contenus dans un litre de sérum.

On peut aussi utiliser 2 cc, 5 de sérum avec 30 cc du mélange alcool-acétone, 1 cc de sérum avec 20 cc du mélange.

B. — GLOBULINES ET ALBUMINES

Nous avons employé deux méthodes différentes suivant la quantité de sérum dont nous pouvions disposer. Celle de MACHEBŒUF appliquée généralement à 25 cc de sérum, celle de HOWE modifiée par LEFROU et BONNET, appliquée à 1 ou 2 cc de sérum.

A. — Méthode de MACHEBŒUF : [12].

Au volume prélevé de sérum on ajoute un égal volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisée par l'ammoniaque. Après quinze à vingt minutes de contact, le précipité est centrifugé, séparé de ses eaux-mères, remis en solution par addition d'un demi-volume d'eau distillée et précipité à nouveau par un demi-volume de sulfate d'ammonium. On recommence encore une fois cette opération pour avoir des globulines ne contenant plus d'albumines. Le culot de globulines est dissous dans la quantité minima d'eau distillée.

La totalité des eaux-mères est additionnée du dixième de son volume de sulfate d'ammonium saturé et d'acide sulfurique $\frac{N}{2}$ jusqu'à pH 3,8 ou 3,9 (nous opérons par le procédé à la touche en employant le bleu de bromophénol comme indicateur). On laisse en contact une vingtaine de minutes et on centrifuge. Les eaux-mères sont éliminées (on s'assure au préalable qu'elles ne contiennent plus que des traces de protéides en ajoutant quelques centimètres cubes d'acide trichloracétique et en chauffant). Le culot d'albumine est délayé dans une faible quantité d'eau distillée (2 à 3 cc) ajoutée très progressivement ; quelques gouttes d'ammoniaque diluée suffisent alors à opérer la dissolution, dès que la neutralité est réalisée.

Les solutions globulinique et albuminique sont ensuite précipitées par l'alcool à 96°. Le coagulum obtenu est traité comme celui qui provient du sérum.

B. — *Méthode de HOWE* (modifiée par LEFROU et BONNET) [13].

a) *Dosage de la sérine.* — Dans un Erlenmeyer de 150 cc bouché à l'émeri verser : 1 cc de sérum et 30 cc de solution à 222 grs. par litre de sulfate de soude anhydre. Cette solution tombera goutte à goutte en imprimant un mouvement de rotation au vase, pour éviter que le précipité adhère au fond du récipient. Ajouter un cristal de thymol, porter à l'étuve à 37° (pour éviter la cristallisation du sel à basse température) au moins 3 heures. Jeter le précipité obtenu sur filtre d'Iéna G4. Recueillir le liquide dans un vase très propre, en prélever 25 cc que l'on additionnera de 0 cc,5 de formol et de 10 gouttes d'acide acétique. Porter à l'ébullition, laisser refroidir. Le précipité albuminique est jeté sur filtre d'Iéna G4. Laver abondamment ce précipité avec de l'eau chaude additionnée d'acide acétique (5 cc d'acide pour un litre d'eau). Arrêter les lavages lorsque le filtrat ne précipite plus par quelques gouttes de chlorure de baryum au 1/10ème, ce qui indique que le précipité de sérine n'est plus souillé par le sulfate de soude. Laver alors le filtre avec quelques centimètres cubes d'alcool-éther (à parties égales), ce qui permettra une dessiccation plus rapide. Porter à l'étuve jusqu'à poids constant.

Soit p le poids trouvé.

La quantité de sérine par litre de sérum sera donc :

$$S = p \times \frac{31}{25} \times 1.000 = p \times 1,24 \times 1.000$$

b) *Dosage direct de la globuline.* — Le précipité de globuline obtenu par la méthode précédente a été recueilli sur filtre taré. Lorsque la filtration est complètement terminée et que l'on a prélevé les 25 cc de filtrat nécessaires au dosage de la sérine, on lave le précipité de globuline avec la solution de sulfate de soude pour entraîner les dernières traces de sérine. On s'aperçoit qu'il n'y a plus de sérum-albumine sur le filtre en additionnant le filtrat d'acide acétique et de formol et en portant à l'ébullition, aucun louche ne doit se produire. Le filtre est alors desséché à l'air et porté à l'étuve à 100° pour coaguler la globuline.

Ce résultat obtenu, il est lavé à l'eau bouillante acétique pour enlever les dernières traces de sulfate de soude (précipitation du chlorure de baryum à 10 %), enfin additionné de quelques centimètres cubes d'alcool-éther. Il est alors reporté à l'étuve jusqu'à poids constant ; on obtient ainsi le poids de globuline contenue dans 1 cc de sérum.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — LAUDAT (M.) : Le dosage de l'urée dans le sang à l'état normal et au cours des états pathologiques. Résultats comparatifs obtenus par les méthodes à l'hypobromite et au xanthidrol.
C. R. Soc. Biol., 1920, 83, 730.
- 2 — FLEURY (P.) : Techniques de chimie biologique.
Faculté de Pharmacie de Paris (1930).
- 3 — ROBERT (J.) : Sur l'emploi des filtres d'amianté pour le microdosage de l'urée.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1931, 13, 1178.
- 4 — MACHEBŒUF (M.) : Méthode permettant le dosage exact du phosphore dans de petites quantités de sang.
Bull. Soc. Chim. biol., 1926, 8, 464.
- 5 — JAVILLIER (M.) et FABRYKANT (M.) : Le phosphore sanguin chez l'homme.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 685.
- 6 — JAVILLIER (M.) et ALLAIRE (H.) : Sur la technique de dosage du phosphore nucléoprotéidique.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 678.
- 7 — LEMELAND (P.) : Recherches sur le dosage des lipoides dans le sang et les tissus. Nouvelle méthode de dosage de l'insaponifiable total et des acides gras totaux.
Bull. Soc. Chim. biol., 1923, 5, 110.

- 8 — CAMINADE (R.) : Sur quelques modifications apportées au dosage de la cholestérine par la méthode de Windaus.
Bull. Soc. Chim. biol., 1922, 4, 601.
- 9 — GUILLAUMIN (Ch. O.) WAHL et LAURENCIN : Sur le dosage des albumines sériques. Comparaison de quelques résultats obtenus par pesée, par azotométrie et par réfractométrie.
Bull. Soc. Chim. biol., 1929, 11, 387.
- 10 — GRICAUT (A.), BOUTROUX et CODOUNIS : Le dosage des protéines du sérum sanguin par précipitation alcoolique.
Bull. Soc. Chim. biol., 1930, 12, 20.
- 11 — KAYSER (F.) : Dosage rapide des protéines dans le sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol., 1930, 12, 523.
- 12 — MACHEBŒUF (M.) : Thèse doctorat ès sciences, Paris (1928).
- 13 — LEFROU (G.) et BONNET (P.) : L'équilibre protéique du sérum sanguin des lépreux.
Bull. Soc. Pathologie exotique, 1934, 27, 35.
-

DEUXIÈME PARTIE

EXPOSÉ HISTORIQUE ET CRITIQUE
DU PROBLÈME DES PROTÉIDES

CHAPITRE I

LES PROTÉIDES SÉRIQUES

Le sérum sanguin est un milieu d'une très grande complexité. Glucides, lipides, protéides, les produits de leur métabolisme et des substances minérales entrent dans sa composition.

Ces constituants contractent entre eux des liaisons de nature et d'intensité très différentes et forment par leur union des systèmes physico-chimiques. Parmi ceux-ci, on doit placer en première ligne ceux qu'on nomme « protéides » du sérum parce que la partie protéidique en est la plus importante pondéralement et la plus caractéristique aux points de vue chimique (teneur en azote, présence de groupements particuliers, etc..) et biologique (propriétés diastasiques, immunologiques, etc...) ; mais en réalité d'autres principes immédiats, en particulier des lipides, leur sont étroitement liés.

Le problème des protéides sériques et de leurs grandes fractions, fera l'objet de ce chapitre (*). Nous tâcherons de dégager d'un ensemble de faits assez confus la conception qu'on peut se faire des globulines et des albumines du sérum sanguin. Nous exposerons ensuite la structure de ces constituants fondamentaux du sérum, en nous attachant surtout aux relations entre lipides et protéides.

(*) Cette question est traitée de façon plus complète par G. SANDOR dans son ouvrage « Le problème des protéides », 1 vol. *Doin* 1933.

RECHERCHES ANALYTIQUES SUR LES PROTEIDES DU SERUM

Vers le milieu du siècle dernier, les savants, imbus de notions qui se montraient si fécondes dans l'étude des substances simples, minérales ou organiques, cherchèrent à isoler du sérum des espèces chimiques par les procédés habituels de l'analyse chimique. Nous verrons plus loin ce qu'il faut penser de leurs espoirs qui furent aussi ceux d'auteurs plus récents.

Il était naturel que l'on cherchât tout d'abord à scinder les protéides par précipitation fractionnée et c'est dans cette voie que furent effectués les plus importants travaux d'isolement des protéides.

FRACTIONNEMENT :

Précipitation par dilution et acidification :

PANUM [1] (1851) semble être le premier auteur qui ait abordé la question. Par acidification du sérum dilué, il obtenait un précipité qu'A. SCHMIDT [2] nomma (1862) *globuline* car il le supposait provenir des globules blancs. Le filtrat contenait encore des matières albuminoïdes à caractère acide que PANUM appela *sérum caséine*.

Plus tard (1877) WEYL [3] remplaça l'acide acétique par l'acide carbonique.

Précipitation par les sels à anion divalent :

Un peu plus tard, on mit en œuvre des procédés d'insolubilisation différents.

HAMMARSTEN [4] (1883-1884) étudia en détails la précipitation du sérum par le sulfate de magnésium, réactif que DENIS [5] (1859) semble être le premier à avoir indiqué comme précipitant des protéides sériques.

Nous devons à POHL [6] (1886) l'emploi du sulfate d'ammonium universellement employé aujourd'hui pour la précipitation fractionnée du sérum.

Deux autres savants KAUDER [7] et surtout HOFMEISTER [8] s'attachèrent à l'étude des zones de discontinuité dans la précipitation fractionnée par les sulfates (*). Pour le sulfate d'ammonium cette concentration critique se trouve aux alentours de la demi-saturation et sert de définition aux deux grands groupes de protéides sériques :

Globulines. Protéides précipitant par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et par le sulfate de magnésium à saturation.

Albumines ou Sérines. Protéides précipitant par le sulfate d'ammonium à saturation.

HOFMEISTER définissait même les limites extrêmes de la précipitation par le sulfate d'ammonium. Si l'on désigne par 10 la saturation complète, les globulines précipiteraient entre les limites 2,9 et 4,6 et les albumines entre 6,4 et 9. Ces chiffres n'ont pas une telle généralité.

Il faut bien noter qu'il n'y a pas identité entre les groupes ainsi définis et ceux de PANUM et d'A. SCHMIDT ; les « globulines » de ses savants ne constituent qu'une fraction des globulines d'HOFMEISTER.

Le résultat de cette série de recherches est donc le suivant :

Une discontinuité nette et assez générale dans la courbe de précipitation fractionnée du sérum par le sulfate d'ammonium permet de définir deux grands groupes de protéides sériques : les globulines et les albumines.

CARACTERES PHYSIQUES DES PROTEIDES

Il était naturel que l'on cherchât à caractériser par leurs propriétés physiques les groupes ainsi définis. Et parmi celles-ci, les constantes électrochimiques et le poids moléculaire offrent un intérêt particulier.

(*) Les zones de discontinuité sont les paliers horizontaux des courbes représentant les quantités de protéides précipitées en fonction du réactif précipitant ajouté.

PROPRIETES ELECTROCHIMIQUES DES PROTEIDES

A. — *Point isoélectrique*

Le transport électrique de particules albuminoïdes fut observé pour la première fois en 1899 par W. B. HARDY [9] sur une solution d'ovalbumine portée à l'ébullition et filtrée. Ces particules sont électronégatives quand le liquide est alcalin et vont à l'anode ; en milieu acide, elles sont électropositives et vont à la cathode. Pour une acidité bien déterminée, les particules et le liquide qui les baigne sont dans le même état de neutralité électrique, le transport est nul : c'est le *point isoélectrique* du protéide considéré.

SÖRENSEN, ayant élaboré des méthodes précises de mesure de la concentration en ions hydrogène, MICHAELIS entreprit de déterminer le point isoélectrique des protéides naturels. Pour la globuline le pH isoélectrique est de 6 environ, pour l'albumine 4,7.

Cette constante physique est d'une grande importance théorique et pratique. C'est pour cette valeur du pH qu'un protéide peut être le plus facilement débarrassé de ses impuretés ionogéniques et que diverses propriétés : pression osmotique, viscosité, nombre d'alcool de FENN (*), conductivité, gonflement, passent par un minimum.

Le point isoélectrique d'un protéide naturel ne peut malheureusement être déterminé avec assez d'exactitude pour être une bonne constante physique et permettre de distinguer l'un de l'autre deux protéides de point isoélectrique voisin. Pourtant, différents travaux, en particulier ceux de VLES [10], relatifs à la mesure des points isoélectriques par inversion de transport (tubes à cataphorèse) nous ont doté d'une méthode assez précise et d'un grand intérêt pratique.

Les travaux récents ont fait apparaître des objections d'ordre théorique très graves. Le point isoélectrique varie avec la concentration et la nature des électrolytes présents

(*) Quantité d'alcool nécessaire pour précipiter l'unité de poids de la substance.

dans le milieu. Cette variation peut atteindre, pour ne parler que des protéides du sérum 0,6 unités de pH.

B. — *Point isoionique*

Le *point isoionique* d'un électrolyte amphotère, un protéide par exemple, est le pH pour lequel celui-ci n'émet pas et n'absorbe pas d'ion hydrogène. Les points isoionique et isoélectrique ne peuvent coïncider que si la charge ne dépend que de l'émission ou de l'absorption des ions H^+ et OH^- .

En général le protéide se trouve dans une solution saline avec laquelle il échange d'autres ions que ceux de l'eau par le jeu, soit d'affinités chimiques, soit d'impuretés adsorbées. Ces ions influent sur la charge du protéide, donc sur le point isoélectrique. Ainsi celui-ci dépend essentiellement du milieu dispersant. Au contraire le point isoionique dépend du seul ion H^+ . Or il semble bien établi à l'heure actuelle que l'ion hydrogène fait partie de la constitution des protéides. Le point isoionique est donc une caractéristique de ceux-ci, alors que le point isoélectrique dépend de conditions extérieures à leur constitution.

SANDOR, qui a fait une étude théorique détaillée et une mise au point de cette question a indiqué une méthode de détermination exacte des points isoioniques.

Celle-ci consiste à transformer les protéides en protéides purs ne contenant que des ions sodium puis à doser la quantité de sodium liée au protéide et après avoir ajouté une dose d'acide équivalente à ce sodium, à prendre le pH de la solution. C'est le point isoionique à quelques millièmes d'unités de pH près.

Une variante de la méthode est celle-ci. On élimine par dialyse contre l'eau distillée (2 à 3 semaines) toute impureté ionique liée au protéide. Il ne reste que des traces infimes de cendres résiduelles (0,5 p. 1.000 environ) dont le rôle exact reste ignoré. On obtient ainsi par dialyse simple des valeurs du point isoionique exactes à 0,1 unité de pH.

Voici quelques chiffres déterminés par SANDOR [11] pour le sérum cheval :

Le point isoionique des globulines varie entre les pH 5.8 et 6.0. Celui des albumines est généralement compris entre 5.10 et 5.14. Dans certains cas, il atteint 5.40.

POIDS MOLECULAIRE

Le poids moléculaire d'un protéide serait une assez bonne constante physique s'il pouvait être déterminé avec certitude et précision.

Les méthodes actuelles de détermination de celui-ci sont d'ordre chimique et physique.

Méthodes chimiques. — Elles consistent à déterminer le taux d'un élément ou d'un acide aminé dont la teneur est maxima dans le protéide considéré et à écrire que celui-ci contient au moins un atome de l'élément ou une molécule de l'acide aminé.

Le nombre déterminé n'est qu'une limite inférieure du poids moléculaire, et ne peut servir que de recoupement aux chiffres obtenus par d'autres méthodes.

Méthodes physiques. — Bien plus intéressantes sont les techniques qui s'appuient sur des propriétés telles que la pression osmotique, la tension superficielle, la vitesse et l'équilibre de sédimentation, la vitesse de diffusion à travers une paroi poreuse.

Le tableau ci-dessous montre que le poids moléculaire de la sérum-albumine oscille autour de 70 000. Celui de la sérum-globuline semblait être fixe aux environs de 150 000 (chiffres de A. ROCHF et J. BRACCIO [12] correspondant avec ceux de SVEDBERG [13] corrigés par MUTZENBECHER [14]). Les recherches récentes de BURR [15] (1937) donnent un chiffre (173.000) voisin de celui d'ADAIR et ROBINSON (175.000).

Auteur	Méthode employée	Sérum-albumine	Sérum-globuline
Sørensen (1925)	Pression osmotique	45.000	80 à 140.000
Adair et Robinson (1930)	Pression osmotique	72.000	175.000
A. Roche et J. Bracco (1934)	Pression osmotique		150.000
Burk (1932)	Pression osmotique	74.000	
Burk (1937)	Pression osmotique		173.000
Svedberg et Sjögren (1928)	Ultra centrifugation	67.500	103.800
Mutzenbecher (1933)	Ultra centrifugation		148.000

La détermination des poids moléculaires par des mesures de pression osmotique peut encore être améliorée, non seulement au point de vue technique mais par une connaissance théorique plus approfondie de la méthode.

Les mesures sont généralement faites sur des solutions aqueuses. J. DUCLAUX (1938) vient d'attirer l'attention des chercheurs sur l'intérêt qu'il y aurait à les répéter avec d'autres solvants non ionisants [16]. On éliminerait ainsi les phénomènes d'association ou de dissociation et la concordance des nombres obtenus serait la meilleure preuve de leur exactitude, comme en cryoscopie.

Les poids moléculaires des différents protéides (dont nous ne nous occupons pas ici) varient en une progression dont le terme initial est de 34.500. SVEDBERG [17] considère les protéides d'un tel poids moléculaire comme « homomolaires » tandis que les autres sont des agrégats de molécules à 34.500 dissociables réversiblement en ces molécules de taille unité.

A la suite d'expériences plus récentes, il semble qu'on doive considérer l'unité comme étant 17.250 et non 34.500.

Ceci s'applique aux protéides intacts qui seraient constitués de molécules ayant une même structure ; les différences de grandeur moléculaire résulteraient du mode d'aggrégation. Pour les protéides dénaturés, les mesures étant faites sur des mélanges en proportions variables de particules de grosseur différente ne signifient plus grand chose.

Les chiffres obtenus par les différents auteurs, malgré quelques discordances qui ne sont pas d'un ordre de grandeur excessif, eu égard aux difficultés d'application et aux erreurs inhérentes à de telles mesures, montrent que les globulines et les albumines séparées du sérum existent sous forme de particules de grandeur définie, assez constante et nettement différente pour chacune d'elles.

CARACTERES CHIMIQUES DES PROTEIDES

Les travaux dont nous allons dire quelques mots montrent que la détermination de leurs constantes physiques permet de différencier beaucoup plus aisément globulines et albumines que leur composition chimique.

ANALYSE ELEMENTAIRE

L'analyse élémentaire ne peut nous être d'un grand secours puisqu'à une même formule brute peut correspondre un nombre très grand de composés différents. Elle a été faite néanmoins par HAMMARSTEN qui donne pour les globulines et les albumines du sérum de cheval des chiffres de C, H, O, N, très voisins ; seules les teneurs en S sont assez nettement distinctes.

ANALYSE DES ACIDES AMINES OBTENUS A L'HYDROLYSE

Les résultats sont plus nets. Certains amino-acides (glycocolle, arginine, lysine, histidine) entrent dans la composition de la globuline mais pas de l'albumine (ABDERHALDEN et MOERNER (1902). D'autres (cystine, proline) y sont en proportions nettement différentes.

INDEX AMINIQUE

Le rapport de l'azote total à l'azote formol titrable ou index aminique est la mesure inverse des groupements aminés libres (OBERMAYER et WILLHEIM) (1913). Il diminue de la fraction la plus précipitable à la fraction la moins précipitable par les sels. Mais les chiffres obtenus sont trop variables pour chaque fraction protéidique, même dans des conditions identiques, pour qu'on en puisse tirer autre chose que des renseignements qualitatifs.

RECHERCHES ANALYTIQUES SUR LES GLOBULINES ET LES ALBUMINES

FRACTIONNEMENT DES GLOBULINES

La non concordance entre la définition des globulines par la méthode de dilution et celle de précipitation saline fut le point de départ des travaux de MARCUS EMIL [18] : le sérum débarrassé par dialyse des fractions insolubles dans l'eau distillée donne encore un précipité abondant par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Il y aurait donc deux fractions dans le système globulinique.

Les travaux entrepris vers la même époque sur les caractères de précipitabilité par FULD et SPIRO [19] et sur le fractionnement immunologique par SENG [20] semblaient étayer une telle classification d'un ensemble imposant de caractères d'ordres très différents.

Les globulines seraient constituées par deux protéides :

1°) *L'Euglobuline*, précipitable par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, insoluble dans l'eau, sans caractère sérologique particulier.

2°) *La Pseudoglobuline*, précipitable par le sulfate d'ammonium entre tiers et demi-saturation, soluble dans l'eau, support des sensibilisatrices dans les antisérums.

Malheureusement la réalité n'est pas aussi simple et les fractions définies par la solubilité ne sont pas identiques à celles définies par la précipitation saline.

FRACTIONNEMENT DES ALBUMINES

HALLIBURTON (1886) distinguait trois fractions albuminiques d'après la température de coagulation, caractère très mal défini et dépendant de facteurs tels que l'acidité, la nature et la concentration en électrolytes.

On ne peut davantage baser une classification sur l'existence d'une albumine cristallisée et d'une albumine amorphe, le rendement de la cristallisation dépendant uniquement des conditions physiques de l'expérience.

AUTRES TRAVAUX SUR LE FRACTIONNEMENT DES PROTEIDES SERIQUES

Travaux de HOWE

Paul E. HOWE (1921) préconisa [21] pour fractionner le sérum l'emploi du sulfate de soude. Au maximum de solubilité la globuline est précipitée en totalité, la sérine reste dans les eaux-mères.

La solubilité du sulfate de soude croît rapidement jusqu'à 32°,38 pour décroître ensuite beaucoup plus lentement. Pratiquement on travaille à l'étuve à +37° avec des solutions à 222 grs de sel anhydre par litre.

Si l'on représente graphiquement les quantités de protéide précipitées en fonction des concentrations croissantes en ce sel, on obtient une courbe à trois paliers. Ces trois zones critiques de précipitation ont pour abscisses les concentrations de 13.5, 17.4 et 21.5 pour 100 de sulfate de soude anhydre.

L'auteur s'appuie sur ces données pour distinguer trois fractions globuliniques qu'il appelle respectivement euglobuline, pseudoglobuline I, pseudoglobuline II.

La méthode a un intérêt pratique ; elle permet de doser les protéides obtenus par azotométrie (ce n'est qu'une mé-

thode approchée) sans chasser le sel par dialyse, ce qu'on est obligé de faire pour le sulfate d'ammonium. De plus, la filtration est beaucoup plus facile qu'avec le sulfate d'ammonium et surtout le sulfate de magnésium qui donne avec le sérum un précipité gélatineux.

On peut obtenir des solutions pauvres en sel (5 %) en refroidissant. Enfin le sulfate de soude n'est pas toxique ce qui permet dans des études biologiques l'injection à l'animal sans dialyse préalable.

Travaux de JAMESON Eloïse et ROBERTS Dorothy.

Ces auteurs (1937) ont appliqué la règle des phases à l'étude des protéides du sérum sanguin [22].

Le sérum frais est additionné à 0° et pH = 6,8 de citrate de potassium à différentes concentrations. Après séparation du précipité formé, on détermine la concentration en protéides et en citrate de la phase liquide.

Les résultats sont consignés dans un diagramme représentatif d'équilibres chimiques, selon GIBBS, en l'espèce le triangle équilatéral. Les constituants sont le protéide, le sel et l'eau. La variation de composition de la phase liquide serait représentée par une droite s'il n'y avait qu'un protéide ; or c'est une ligne brisée.

La première cassure se produit pour des concentrations en citrate de 22-23 %, pour le sérum de cheval et de 24-25 % pour celui du rat. La deuxième cassure apparaît pour le sérum d'homme au pH = 5,5 et pour le rat femelle par changement de température. La troisième cassure est nette pour le sérum d'homme et de rat mâle mais non de cheval.

Les auteurs concluent qu'il existe dans le sérum quatre sortes de protéides définis.

Travaux de TISELIUS Arne

En soumettant divers échantillons de sérum à l'électrophorèse, TISELIUS (1937) a pu séparer outre l'albumine trois globulines qu'il désigne par les lettres α , β , γ ; elles ont le

même poids moléculaire mais leurs propriétés électrochimiques (point isoélectrique, mobilité) sont différentes [23].

L'étude du sérum de lapins ayant reçu de nombreuses injections d'ovalbumine a montré que les anticorps étaient transportés avec la globuline γ dans le champ électrique. Cette méthode permet donc de concentrer les substances spécifiques des antisérums.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — PANUM : *Virchow. Arch.*, 1851, 3, 251 ; et 4, 419.
- 2 — SCHMIDT (A.) : *Reichters und Du Bois Raymond Arch.* (1862).
- 3 — WEYL (Th.) : *Beitrage sur Kenntnis tierischer und pflanzlicher Eiweisskörper. Zeitsch. f. phys. Chem.*, 1877, 1, 72.
- 4 — HAMMARSTEN : Cf. *Lehrbuch der physiologischen Chemie. München* (1922).
- 5 — DENIS : *Mémoire sur le sang. Paris* (1859).
- 6 — POHL (J.) : *Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins in Harn und in serösen Flüssigkeiten. Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1886, 20, 246.
- 7 — KAUDER : *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1886, 20, 411.
- 8 — HOFMEISTER : *Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1888, 24, 247.
- 9 — HARDY (W.B.) : *Proc. roy. Soc.*, 1900, 66, 110.
- 10 — VLES (F.) : *Nouveaux tubes à cataphorèse. Arch. Physique biologique*, 1927, 6, 139.
- 11 — SANDOR (G.) : *Point isoionique des protéides du sérum. Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, 18, 877 et 1937, 19, 555.
- 12 — ROCHE (A.) et BRACCO (J.) : *Pression osmotique et poids moléculaire des globulines du sérum. Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, 16, 1479.

- 13 — SVEDBERG et SjöGREN : The molecular weight of serum albumin and of serum globulin.
Journ. of amer. chem. Soc., 1928, 50, 3318.
- 14 — MUTZENBECHER : Die analyse des Serums mit Ultracentrifuge.
Bioch. Zeitschrift, 1933, 266, 226.
- 15 — BURK (N.F.) : Osmotic pressure, molecular weight and stability of serum globulin.
The J. of biol. Chemistry, 1937, 121, 373.
- 16 — DUCLAUX (J.) : Pression osmotique des protéides dans les solvants autres que l'eau.
Volume jubilaire en l'honneur du Professeur S.P.L. Sørensen pour son 70^e anniversaire, 1938, p. 155.
- 17 — SVEDBERG (Th.) : Les molécules dans un champ centrifuge intense.
J. de Phys. et le Radium, 1931, 7. 2 n° 7, 227.
- 18 — MARCUS EMIL : *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1899, 28, 509.
- 19 — FULD et SPIRO : Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes.
Zeitschrift für physiologische chemie, 1900, 31, 132.
- 20 — SENG (W.) : *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1899, 31, 513.
- 21 — HOWE (P. E.) : The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood.
Jl. of. biol. Chem., 1921, 49. 93.
- 22 — JAMESON (E.) et ROBERTS (D.) : *J. gen. Physiol.*, 1937, 20, 475.
- 23 — TISELIUS (Arne) : *Biochem. J.*, 1937, 31, 1478.
-

CHAPITRE II

PREMIÈRE DISCUSSION SUR LA NATURE DES PROTÉIDES SÉRIQUES ET LEURS RELATIONS RÉCIPROQUES

Un travail de longue haleine (1917 à 1930) a été entrepris par S. P. L. SÖRENSEN [1] pour essayer de résoudre le problème de la nature physique des protéides naturels.

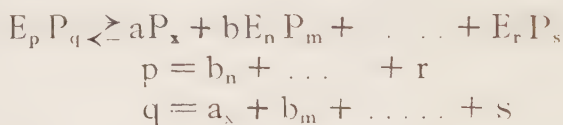
Etudiant en premier lieu les solutions d'ovalbumine cristallisée, il a montré qu'elles possédaient les propriétés essentielles des solutions vraies. L'albumine d'œuf cristallisée est une substance bien définie qui a un coefficient de solubilité sensiblement constant (*). Son poids moléculaire est connu avec beaucoup de certitude et il y a un accord remarquable entre les chiffres obtenus par des méthodes aussi différentes que la pression osmotique (SÖRENSEN - 1917) la tension superficielle (LECOMTE DU NOÛY - 1925), l'ultracentrifugation (SVEDBERG et NICHOLS - 1926), la vitesse de diffusion (Mc BAIN, DAWSON et BARKER - 1934). La valeur de ce poids moléculaire est de 34.500 à 35.000. SÖRENSEN la considère comme une espèce chimique.

L'auteur s'est alors attaqué aux protéides du sérum de cheval.

(*) S.P.L. SÖRENSEN, M. SÖRENSEN et M. MACHEBŒUF. (C.R. lab. Carlsberg 1927, vol. 16, N° 12) ont toutefois montré que ce coefficient augmente légèrement avec la concentration de l'ovalbumine.

La sérum-albumine est déjà beaucoup plus complexe et bien qu'elle soit cristallisable, il n'a pu la regarder comme une espèce chimique.

Plus complexe encore est la sérum-globuline dont aucune fraction n'a pu être obtenue à l'état cristallisé. Par dialyse contre l'eau distillée, elle se dissocie en euglobuline E et pseudoglobuline P, la première insoluble, la deuxième soluble dans l'eau. La globuline elle-même serait un complexe de la forme $E_p P_q$ susceptible de se dissocier réversiblement suivant le schéma :



la composition de la fraction dissoute dépendant de la solubilité des différentes combinaisons, par conséquent de la teneur en sels et de la concentration en globuline.

SÖRENSEN pense que les protéides sont formés par des complexes unis entre eux en un système de composants par des valences résiduelles (*forces de valence secondaire*) pouvant s'ouvrir par voie réversible. Chaque composant serait formé par des chaînes polypeptidiques (et lipidiques) unies par des valences principales (*forces de valence primaire*).

Beaucoup de biochimistes admettent aujourd'hui que les protéides naturels ont des poids moléculaires multiples de 34.500 (ou de 17.250). D'aucuns pensent que seuls existent les termes d'une progression arithmétique (peut être même géométrique) dont la raison serait ce chiffre, *unité fondamentale*.

L'ovalbumine serait constituée par une unité à 34.500, la sérum-albumine en comporterait deux, la sérum-globuline quatre (cinq selon certains auteurs).

Cette conception nouvelle est en bon accord avec les faits. Elle met en lumière une unité de structure qui est à la base de la constitution des protéides naturels.

Limitant notre examen à ceux du plasma sanguin, cherchons à faire ressortir leurs différences et les relations qu'ils présentent entre eux.

Si on les range par ordre de précipitabilité décroissante (leur définition est précisément basée sur ce caractère) on obtient la série :

Fibrinogène ; Euglobuline ; Pseudoglobuline ; Albumine.

Cet ordre est naturellement celui des pH isoélectriques décroissants à partir de la neutralité (fibrinogène : 7,2 ; globuline : 5,6 ; albumine : 4,7) et aussi celui des températures de coagulation croissantes. Cette gamme est également celle de leur néoformation ; après les hémorragies, la réparation se fait dans l'ordre : fibrinogène, globuline, albumine.

D'autres propriétés sont fonction de la précipitabilité. Dans le groupe des globulines, les fractions successives précipitées par le sulfate d'ammonium sont de moins en moins riches en C, N et S et de plus en plus riches en H comme l'ont montré PORGES et SPIRO [2].

Concentration en sulfate d'ammonium (Notation de Hofmeister)	C %	H %	N %	S %
3,0 à 3,7	52,6	7,70	16,0	1,13
3,7 à 4,4	50,4	7,75	15,5	0,98
4,4 à 5,0	47,5	8,07	14,4	0,92

Encore les résultats obtenus sont-ils fonction du réactif précipitant.

Le sulfate de soude a permis à HOWE [3], de distinguer quatre fractions protéidiques, comme nous l'avons vu précédemment. Le citrate de potassium (JAMESON et ROBERTS) [4] amène à une conclusion semblable en apparence : il y aurait quatre fractions protéidiques mais celles-ci dépendraient à la fois de l'espèce animale et du sexe ; ce résultat est à rapprocher de ceux de VLES [5] qui distingue chez l'être humain normal des points isoélectriques différents suivant le sexe et aussi l'état sexuel. Les recherches de TISELIUS [6] sur l'électrophorèse du sérum le conduisent également à distinguer trois globulines et une albumine.

Les courbes de précipitation par les sulfates d'ammonium et de sodium ne sont pas réductibles l'une à l'autre.

Le premier de ces sels acidifie le milieu, le second ne change pratiquement pas le pH. L'addition d'ammoniaque au sulfate d'ammonium introduit un nouveau facteur.

Les résultats obtenus sont encore fonction du sérum. La définition de la globuline par sa précipitabilité au sulfate d'ammonium à demi-saturation est générale mais souvent arbitraire.

Enfin une définition qui s'applique à un sérum normal peut n'être plus vraie pour un sérum pathologique. La probabilité pour que les différentes propriétés qu'on peut utiliser pour définir les protéides sériques varient parallèlement au cours de modifications dues à des causes biologiques est sensiblement nulle.

Le manque d'une définition chimique se fait particulièrement sentir quand on veut résoudre le problème suivant :

Au cours de la plupart des maladies, il y a augmentation des globulines (G) et diminution des sérines (S) c'est-à-dire baisse de l'*index albuminique* $\frac{S}{G}$. Nous avons montré en particulier [7] que chez les génisses inoculées avec des doses massives de virus vaccinal, cette transformation s'effectue en quelques jours et sans changement notable du taux des protéides totaux.

Bien plus, N. FISSINGER, GAJDOS et PANAYOTOPOULOS [8] ont observé au cours du choc histaminique une baisse considérable de $\frac{S}{G}$ (dans le rapport de 2 à 1) en une trentaine de minutes.

Quelque représentation qu'on se fasse des grandes fractions protéidiques du sérum il est bien difficile d'admettre que des édifices aussi complexes aient pu se transformer l'un dans l'autre en un temps aussi court. Il est plus logique de penser qu'il y a eu changement des limites de précipitabilité.

Continuons l'examen des faits d'ordre physique et biologique qui peuvent nous aider à comprendre les relations de ces protéides entre eux et leur transformation possible.

a) Le vieillissement du sérum *in vitro*, le chauffage, l'exposition aux radiations X et ultraviolettes amènent une

augmentation de la globuline avec diminution de la sérine (MOLL [9], RUPPEL, RUSNYAK).

b) Chez le lapin, la teneur en globuline, faible à la naissance, croît jusqu'à la maturité, la sérine variant très peu (YOSHIMONI MIWA).

c) Le rapport $\frac{S}{G}$ du sérum de la mère est moins élevé que celui de l'enfant au moment de l'accouchement (sang qui s'écoule par le bout placentaire du cordon ombilical) comme l'ont montré Ch. ACHARD, BARIETY et CODOUNIS [10] (1929) ainsi que C. GUTMAN et G. LEVY [11] (1934).

d) Il y a baisse de l'index albuminique chez les chevaux au cours de l'immunisation par le bacille typhique avec tendance au retour à la normale après les injections (JONESCU-MIHAIESTI et DAMBOVICEANU [12]).

e) Au cours des maladies, il y a presque toujours diminution de ce rapport.

Il semble donc que la diminution de l'index albuminique soit une caractéristique de *vieillesse* aussi bien *physique* que *biologique* (*). Ce processus serait accéléré pendant les maladies et l'augmentation qui se produit quelquefois au cours de la guérison n'interromprait que pour un temps limité sa tendance générale à la diminution.

Au cours du vieillissement physique et biologique il y a augmentation de la précipitabilité des protéides sériques ; le rapport des protéides précipitables par le sulfate d'ammonium à demi-saturation aux protéides totaux a augmenté.

Il a pu se produire un phénomène purement physique de grossissement de la micelle lipoprotéidique, deux granules albuminiques à deux unités fondamentales chacun se condensant en un granule globulinique qui est, comme nous l'avons appelé, formé de quatre unités.

Cette représentation s'accorderait avec la théorie d'A. LUMIERE [13] de la floculation colloïdale et du grossissement des grains colloïdaux, cause du vieillissement.

(*) Nous désignons par *vieillesse physique* l'ensemble des modifications qui se produisent dans un sérum pendant sa conservation *in vitro* et par *vieillesse biologique* celles que lui impriment *in vivo* l'âge et la maladie.

BOUTARIC et Mme ROY [14] ont observé que l'opacité du sérum croît avec le temps ce qu'ils interprètent comme un grossissement des particules colloïdales au sein de la solution physiologique.

Peu d'auteurs ont cherché à résoudre objectivement le délicat problème de savoir si le protéide apparu au cours du vieillissement devait être rapproché par ses caractères chimiques de la sérine ou de la globuline.

Malgré les conclusions divergentes des auteurs, on peut penser qu'il y a, dans un premier temps, changement des limites de précipitabilité, peut-être condensation. Cette première phase, purement physique pouvant être suivie d'une deuxième phase, plus lente, de transformation chimique de sérine en globuline.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — SORENSEN (S. P. L.) : C. R. lab. Carlsberg., 1917 à 1930.
- 2 — PORGES et SPIRO : Die Globuline des Blutserums.
Hofmeisters Beitrage, 1903, 3, 276.
- 3 — HOWE (P. E.) : The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood.
J. of biol. chem., 1921, 49, 93.
- 4 — JAMESON (E.) et ROBERTS (D.) : *J. gen. Physiol.*, 1937, 20, 475.
- 5 — VLES (F.) : Recherches sur les propriétés physico-chimiques des tissus en relation avec l'état normal ou pathologique de l'organisme. 3^{me} partie : recherches sur le sérum.
Arch. Phys. biol., 1926, 5, 161.
- 6 — TISELIUS (A.) : *Bioch. J.*, 1937, 31, 1478.
- 7 — DELAGE (B.) : Recherches sur le sérum sanguin chez la génisse au cours de la maladie vaccinale.
Bull. Soc. Chim. biol., 1937, 19, 1407.

- 8 — FISSINGER (N.), GAJDOS et PANAYOTOPOULOS : Equilibre protéidique du sérum au cours du choc histaminique.
C.R. Soc. Biol., 1936, **123**, 967.
- 9 — MOLL (L.) : Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin.
Hofm. Beitr., 1904, **4**, 563.
- 10 — ACHARD (Ch.), BARIETY (M.) et CODOUNIS : Equilibre protéique comparé dans le sang de la mère et du cordon ombilical.
C. R. Soc. Biol., 1937, **102**, 984.
- 11 — GUTMAN (Mlle C.) et LEVY (Mme G.) : Recherches biochimiques sur le rôle du placenta.
Bull. Soc. Chim. biol., 1934, **16**, 720.
- 12 — JONESCU-MIHAIESI et DAMBOVICEANU : Modifications de certaines constantes du sérum de cheval au cours de l'immunisation.
C. R. Soc. Biol., 1930, **104**, 1357.
- 13 — LUMIERE (A.) : La vie, la maladie et la mort, phénomènes colloïdaux.
Paris, *Masson*, 1 vol. (1928).
- 14 — BOUTARIC (A.) et ROY (Mme M.) : Variations de la densité optique et de la viscosité des sérums par dilution dans la solution physiologique.
Bull. Soc. Chim. biol., 1937, **19**, 44.
-

CHAPITRE III

RELATIONS

DES LIPIDES AVEC LES PROTÉIDES

LES CÉNAPSES

GENERALITES SUR L'ETAT DES LIPIDES DANS LA MATIERE VIVANTE (*)

TRAVAUX DE CHIMIE PHYSIOLOGIQUE

Dans les tissus animaux, une partie des lipides se trouve à l'état libre et constitue une réserve énergétique qui est consommée au cours du jeûne ; c'est *l'élément variable* des physiologistes. Mais au moment de la mort par inanition, l'organisme contient encore des lipides qui font partie intégrante de la matière vivante. La mort de l'animal survient lorsque la quantité d'acides gras contenue dans l'unité de poids corporel a atteint une limite fixe, caractéristique de chaque espèce zoologique, et que les biochimistes appellent *élément constant*.

Au point de vue chimique ce sont des graisses, mais au point de vue physiologique l'organisme est incapable de les utiliser comme telles puisqu'à la mort par inanition on les retrouve intégralement.

(*) Nous n'exposerons que les grandes lignes de ce problème qui est traité en détails par M. MACHEBŒUF dans son ouvrage « Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique ». 1 vol. Hermann, 1936.

Ce problème a été particulièrement étudié par TERROINE [1], [2] et son école [3].

Les travaux des physiologistes établissent donc qu'outre leur rôle de réserve les lipides sont des constituants fondamentaux de la matière vivante.

Mais les lipides tissulaires sont dans un état spécial qui les rend inextractibles à leurs solvants habituels, comme le vit HOPPE-SEYLER [4] en 1866. Cet auteur pensa à l'existence de complexes lécithine-albumines et leur donna le nom de *lécithalbumines*. Il n'apporta pas de preuve directe de cette assertion, mais il montra que l'extraction des lipides exige un épuisement prolongé par l'alcool bouillant.

LIEBERMANN [5] (1893) montra que ces faits ne sont pas isolés et se retrouvent dans toute l'échelle animale et végétale. Citons encore les noms de DORMAYER [6] (1896) et d'ERLANDSEN [7] (1907) ; ce dernier au cours de ses recherches isola du muscle cardiaque une graisse phosphorée, la *cuorine*.

Pour ces savants, l'union entre lipides et protéides était d'ordre chimique. Pour d'autres, parmi lesquels BANG [8] (1909) une théorie physique rendrait compte de l'inextractibilité des lipides tissulaires ; les travaux de BANG étaient limités aux seuls globules rouges ce qui en restreint singulièrement la portée.

TRAVAUX D'HISTOLOGIE ET DE CYTOLOGIE

L'anatomie microscopique a fourni aussi sa contribution au problème des complexes lipides-protéides.

Certains colorants dits « vitaux » (rouge neutre, vert janus, soudan III) employés à une concentration assez faible ont la propriété de colorer les tissus vivants sans les tuer. L'apparition brusque d'une coloration foncée annoncerait la mort, celle-ci ayant pour corollaire la destruction des liens unissant protéides et lipides : ces derniers, mis en liberté, prendraient alors énergiquement le colorant.

A. LUMIERE [9] explique le fait par sa théorie de l'« immunité du granule micellaire ». Celui-ci serait protégé par sa charge électrique. La floculation traduirait la mort de la

micelle ; la décharge de celle-ci permettrait aux réactions chimiques de s'effectuer.

Dans certains tissus, la mise en liberté des graisses (appelée aussi *lipophanérose*) ne se fait pas aussi facilement. Elle nécessite l'intervention des protéidases : la pepsine et la trypsine sont de véritables révélateurs des graisses. D'où la technique de « démasquage » de CIACCIO [10] (1926).

THÉORIE DES « LIPIDES VIVANTS »

Pour HANSTEEN CRANNER [11] (1919) les lipides seraient chez les êtres vivants dans un état spécial qui disparaîtrait après la mort. Certains végétaux coupés et immergés dans l'eau y laissent diffuser des lipides solubles et pas de protéides. Il s'agit en réalité de sels d'acides phosphatidiques, les acides eux-mêmes étant solubles dans l'éther.

MACHEBŒUF, G. LEVY et M. FAURE [12] (1935) ont par exemple observé que, parmi les lipides du bacille tuberculeux, ceux qui sont doués du pouvoir haptène sont voisins des acides phosphatidiques et tellement hydrophiles que si on agite leur solution éthérée avec l'eau ils quittent l'éther pour passer dans l'eau.

LES « LIPOPROTÉIDES ARTIFICIELS »

Les auteurs précédents s'étaient attachés à l'étude analytique des complexes formés de lipides et de protéides. Mettant en œuvre des procédés de synthèse, VON PRZYLECKI et ses collaborateurs [13] essayèrent de combiner ces principes immédiats en des systèmes qu'ils appelèrent *symplexes*.

Dans une première série de recherches (1935-1936) ils étudièrent l'affinité des constituants des protéides, en particulier des amino-acides, pour les holosides ; ils montrèrent que le groupement amidé-CONH ne joue aucun rôle dans la constitution de ces *polysaccharo-protéides*. Deux amino-acides seulement, l'arginine et la tyrosine, ont de l'affinité pour les holosides. L'arginine, par exemple, s'unit aux pH supérieurs à 7 avec certains composés de nature glucidique tels que l'amylose en donnant des complexes de pouvoir rotatoire inférieur à la somme de ceux des composants.

S'attaquant alors aux lipides (1936), les auteurs essayèrent d'obtenir artificiellement des complexes de ces principes

immédiats avec les protéides (*Künstliche Lipoproteide*) et d'étudier leur stabilité, la constance de leur union et leurs propriétés principales.

Les résultats obtenus ne sont pas uniformes. Beaucoup de protéides donnent des précipités avec la lécithine et surtout l'acide oléique. Avec l'huile d'olive, on obtient des résultats bien inférieurs.

La formation du précipité dépend du pH et des proportions pondérales des composants. Une fois formé, on peut le soumettre à des variations d'acidité sans l'altérer. L'alcool n'extraît qu'en partie ses lipides dont la séparation totale exige l'action combinée de l'alcool et de l'éther. Les sels n'ont guère d'influence sur la stabilité de ces lipoprotéides.

Ces travaux sont intéressants car ils montrent que l'on peut reproduire par synthèse des systèmes physico-chimiques ayant les propriétés essentielles des complexes lipoprotéidiques naturels.

LES LIPIDES DU SÉRUM SANGUIN

Il suffit de savoir que l'extrait lipoïdique du sérum sanguin normal chez les mammifères est généralement compris entre 1 gr. 50 et 8 gr. par litre pour comprendre que, comme dans les autres tissus, les lipides y sont dans un état tout à fait particulier.

Le sérum, prélevé dans les conditions énoncées, est parfaitement limpide et presque optiquement vide (LECOMTE DU NOÛY) [14]. Dans certains cas physiologiques (sérum d'anguille) ou pathologiques (sérum de néphrose lipoïdique) le taux des lipides peut s'élever au chiffre énorme de 40 grs par litre sans que le sérum cesse d'être parfaitement clair et homogène. D'ailleurs si les lipides qui sont insolubles dans l'eau se trouvaient à l'état libre dans le sérum, ils formeraient une suspension fortement opalescente, extrêmement riche en particules décelables à l'ultramicroscope.

Les solvants des graisses (éther, benzène, chloroforme etc...) n'en arrachent au sérum que des quantités infimes (1 à 5 % en moyenne).

MACHEBŒUF et WAHL [15], (1931) montrent l'extraordinaire résistance des lipides du sérum à l'extraction étherée. Ainsi au bout de 5 mois d'extractions répétées trois fois par semaine, ils n'avaient libéré que le tiers des lipides totaux ; au bout d'un an, un peu moins de la moitié.

Les lipides sont entraînés avec les protéides dans les précipités réversibles que donnent avec le sérum les solutions concentrées de sulfates alcalins et alcalino-terreux.

Ainsi, il existe en solution homogène dans le milieu aqueux des lipides cachés à leurs réactifs et des protéides qui réagissent avec les leurs. Tout se passe comme si les protéides du sérum augmentaient la solubilité des lipides dans la phase aqueuse et les stabilisaient par un processus de « protection colloïdale ». NEUSCHLOSZ [16] parle de solution d'un colloïde dans un autre ; cela ne résout pas le problème.

Les travaux sur les relations entre protéides et lipides du sérum sont très nombreux mais souvent confus, cette question n'étant généralement traitée qu'accessoirement au cours de recherches sur le fractionnement des protéides ou le dosage des substances lipoïdiques.

PHOSPHORE DES PROTÉIDES

ARONHEIM, élève de HOPPE-SEYLER, semble être le premier auteur qui se soit attaché à l'étude du phosphore des protéides. Il montre que la globuline du sérum de cheval contient du phosphore extractible par l'alcool et l'éther. A ce protéide est donc lié un lécithide.

Vers le début du siècle, le fractionnement des globulines faisait l'objet de nombreux travaux ; certains savants se demandent si les différentes fractions globuliniques ne peuvent être caractérisées par leur teneur en phosphore.

Ces vues théoriques sont le point de départ des recherches de HARDY [17] (1905) et HASLAM [18] (1913) qui montrent que le phosphore caractérise l'euglobuline alors que la pseudoglobuline en est dépourvue.

Cette constatation donne naissance à une théorie d'abord soutenue par HANDOWSKY et WAGNER [19] (1911) puis par Mme Harriette CHICK [20] (1914) qui essaie d'établir que

l'euglobuline est un complexe formé par l'union de la pseudoglobuline avec un phosphoaminolipide.

H. CHICK sépare l'euglobuline par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, puis la pseudoglobuline par ce sel à demi-saturation. Par dialyse de la pseudoglobuline il précipite un protéide ayant les caractères de l'euglobuline et contenant toujours de la lécithine. Après avoir séparé l'euglobuline ainsi formée, il reste un protéide qui ne contient plus de phosphore. Si on ajoute de la lécithine au milieu, il y a néoformation d'euglobuline jusqu'à ce que toute la lécithine soit utilisée.

SÉPARATION QUANTITATIVE DES SUBSTANCES LIPOIDIQUES

A côté de ces recherches d'ordre théorique, il faut citer des travaux qui ont pour but le dosage des lipides et des protéides. Les méthodes de séparation précédemment employées étaient défectueuses ; l'extraction des lipides était incomplète.

KUMAGAWA et SUTO [21] (1908) instituent leur méthode de dosage des lipides sur un matériel de recherches unique : la poudre de viande desséchée. Elle comporte essentiellement une saponification aqueuse suivie d'une extraction éthérée.

C'est LEATHES [22] (1909) qui conseille l'emploi d'alcool pour permettre la dissolution des savons formés et SHIMIDZU [23] (1910) qui met au point la méthode d'extraction continue par l'alcool bouillant dans l'appareil de KUMAGAWA, technique dont le principe est universellement adopté aujourd'hui.

GRIGAUT [24] (1912) indique deux méthodes de dosage du cholestérol. Sa méthode colorimétrique est la plus connue ; elle consiste essentiellement à rendre le cholestérol soluble dans l'éther par l'alcool en milieu alcalin. Le dosage est ensuite effectué en utilisant la réaction colorimétrique de LIEBERMANN.

Le cholestérol ne se trouvant pas à l'état libre dans le sérum, l'auteur suppose qu'il est engagé avec les protéides dans des complexes qu'il appelle *protéocholestérides* [25] mais il ne donne aucune preuve directe de leur existence.

Ce terme, d'ailleurs, non conforme aux règles actuelles de la nomenclature chimique, ne peut être conservé.

EXTRACTION DES LIPIDES DU SÉRUM A BASSE TEMPÉRATURE

Pour étudier le rôle des lipides sériques, la méthode la plus rigoureuse consistait à comparer au sérum intact le sérum privé, tout au moins partiellement, de ses lipides. HARDY et GARDINER montrent que cette opération est réalisable par d'autres procédés que la dénaturation par l'alcool chaud. Cette méthode, employée par les auteurs précédemment cités, modifie complètement les propriétés physiques des complexes lipoprotéidiques.

W. B. HARDY et Mme S. GARDINER [26] (1910) ont pu délipider presque totalement le sérum sans dénaturer les protéides. Leur méthode consiste à faire agir l'alcool absolu refroidi à -10° sur le sérum préalablement maintenu dans la glace fondante ; lorsque celui-ci est complètement déshydraté, on l'épuise par l'éther anhydre à froid dans un appareil de SOXHLET, et on chasse l'éther dans le vide sulfurique. La précipité a gardé ses propriétés caractéristiques : il est soluble dans l'eau ; de sa solution on peut précipiter la globuline par le sulfate d'ammonium à demi-saturation puis l'albumine par acidification.

L'intérêt de ces recherches est considérable ; elles ont permis à SÖRENSEN [27] puis à MACHEBŒUF [28] d'étudier comparativement les propriétés des complexes lipoprotéidiques et des protéides délipidés.

YOUNG [29] (1922), se basant sur des mesures polarimétriques estime que la sérum-albumine est liée peu énergiquement aux esters du cholestérol. Il obtient par délipidation une albumine purifiée avec un rendement excellent.

ETUDE DES LIAISONS LIPIDES-PROTÉIDES

Certains auteurs s'attachèrent à étudier avec quelles fractions protéidiques sont entraînés les lipides au cours des différents procédés de fractionnement physico-chimique.

a) *Précipitation fractionnée*

HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE [30] (1925) et BOSSE [31] (1925) étudient les liaisons lipides-protéides dans le sérum de bœuf. Ils précipitent le sérum à chaud en milieu acidulé par l'acide acétique ou bien par le sulfate d'ammonium ; la totalité des phosphatides et 70 à 80 % du cholestérol passent dans le filtrat ; la précipitation de la globuline seule n'entraîne que 20 à 30 % du cholestérol. Les auteurs concluent que seuls les complexes cholestérol-globuline et cholestérol-phosphatides sont bien caractérisés et que les liaisons des protéides avec les phosphatides sont lâches.

Ces recherches faites dans des conditions de température qui altèrent la structure lipoprotéidique ne sont pas bien probantes.

Ils extraient ensuite le sérum avec de l'éther mais dans des conditions de température et d'agitation telles qu'on peut se demander ce que devient la structure du système lipoprotéidique dans ces conditions. Les conclusions de ces expériences sont les suivantes : plus il y a d'euglobuline dans un sérum, moins on peut extraire de cholestérol par l'éther, plus il y a d'albumine, plus les complexes lipoprotéidiques sont fragiles. La présence de glucose et de sels minéraux influencerait sur le phénomène.

TROENSEGAARD et KOUDAHL [32] (1926) préparent les globulines et les albumines par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, les coagulent et les déshydratent complètement par l'alcool. L'extraction est faite à l'aide d'éther à froid à partir de ces poudres protéidiques.

Les auteurs extraient des albumines une quantité notable de lipides alors que les globulines n'en livrent que des traces. Les globulines contiennent pourtant du cholestérol car leur acétylation donne des carbures d'hydrogène identiques à ceux que donne ce stérol par acétylation. Les auteurs en concluent que le cholestérol est un groupement prosthétique de la globuline.

Ces recherches, faites sur des protéides dénaturés et par conséquent dans un état physico-chimique très différent de celui des protéides naturels ne peuvent nous convaincre.

Les modifications qui se produisent dans le sérum au cours de processus aussi doux que le vieillissement (*) nous apprennent qu'il faut être très circonspect en pareille matière.

En 1927, GARDNER et GAINSBOROUGH [33] constatent que la précipitation des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation entraîne environ 30 % du cholestérol ; mais il reste encore 70 % dans les eaux-mères contenant les albumines, celles-ci sont parfaitement limpides, malgré leur teneur élevée en lipides.

b) *Fractionnement par électrophorèse*

FRANKENTHAL [34] (1925) puis WOLFF et FRANKENTHAL [35] (1926) fractionnent le sérum par électrodialyse et admettent aussi que la majeure partie des lipides est liée à la globuline. Dans les sérums qui donnent une réaction de WASSERMANN positive, les lipides accompagneraient la sérine.

C'est également au fractionnement électrophorétique du sérum que MELLANDER (1935) fait appel pour essayer de résoudre le problème du mode de liaison des lipides aux protéides [36]. Employant le procédé de THEORELL [37], l'auteur constate que, par cataphorèse du sérum total, le cholestérol puis la sérine se transportent à l'anode. Le compartiment cathodique au contraire s'enrichit en globuline. Le cholestérol existerait donc à l'état libre en dehors de tout complexe protéidique.

(*) Voir 4^{me} partie, chap. 6.

TRAVAUX DE M. MACHEBŒUF :

I. — *Isolement d'un complexe lipido-protéidique*

Tâchons de préciser l'état de la question après les recherches de GARDNER et GAINSBOROUGH.

Les derniers travaux que nous venons de citer, dont on ne peut méconnaître le très grand intérêt, montrent que l'existence de complexes lipoprotéidiques est très probable. Leurs auteurs sont presque d'accord pour reconnaître que la globuline forme avec le cholestérol un système d'une stabilité assez grande, mais les preuves qu'ils en donnent sont toutes indirectes. D'autre part, il est admis à ce moment que ces complexes sont les seuls et qu'en particulier l'albumine ne forme avec les lipides que des composés éphémères et très mal définis qui ne sauraient présenter le même intérêt que ceux de la globuline avec le cholestérol.

Or c'est précisément au système albuminique que MACHEBŒUF s'attaque (1929) ; il en isole un complexe lipoprotéidique bien défini, fournissant ainsi la preuve directe de l'existence dans le sérum de cheval de liaisons protéides-lipides.

L'auteur sépare les globulines du sérum par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et montre que, si l'on ajoute un excès de sulfate d'ammonium et de l'acide sulfurique dilué jusqu'à $\text{pH} = 3,8$, la précipitation des albumines et des lipides est à très peu près quantitative. Le précipité, séparé de ses eaux-mères, se remet parfaitement en solution limpide si l'on ramène le pH aux environs de 7 à l'aide d'un peu d'ammoniaque dilué [38].

Une seconde acidification à $\text{pH} = 3,8$, donne un nouveau précipité, mais la teneur en sels étant plus faible, une

notable partie des protéides reste en solution. À chaque opération de dissolution à $\text{pH} = 7$ et de précipitation à $\text{pH} = 3,8$ avec élimination des eaux-mères, il obtient une substance de plus en plus riche en lipides et de plus en plus pauvre en protéides mais dont la constitution tend à se fixer. Vers la septième précipitation elle devient constante (60 % de protéides et 40 % de lipides : stériles et phosphatides).

Malgré sa teneur énorme en lipides, la substance est très soluble dans l'eau et d'une grande résistance à l'extraction étherée. L'alcool ne précipite les protéides que très lentement et incomplètement.

Ainsi, dans ce complexe, non seulement les lipides sont solubles dans l'eau et insolubles dans leurs solvants (éther, benzène...) mais les protéides eux-mêmes sont masqués à leur réactif coagulant, l'alcool. Ces propriétés particulières sont dues à leur action réciproque et non à une substance possédant la propriété de solubiliser les lipides comme l'a vérifié l'auteur.

Ce qui constitue l'intérêt de ces recherches c'est la constance de composition du complexe de MACHEBŒUF au cours des précipitations et dissolutions successives. On est en droit de penser que lipides et protéides sont liés entre eux non par simple adsorption comme le pense SÖRENSEN, mais par des forces chimiques.

MACHEBŒUF a proposé (1936) le terme de *cénapse* [39] pour désigner les produits biologiques résultant de l'union par des forces connues ou inconnues de deux ou plusieurs constituants de la matière vivante. Les mélanges sont évidemment exclus de ce terme qui implique la modification des propriétés des constituants.

Ainsi, l'auteur appelle *cénapses lipoprotéidiques* les produits de l'union de lipides avec les protéides.

II. — Etude de la néphrose lipoïdique :

Pour connaître le rôle de chaque constituant des *cénapses lipoprotéidiques*, MACHEBŒUF [40] avec WAHL puis SANDOR étudie le sérum sanguin dans une maladie caractérisée par un déséquilibre lipoprotéidique : la néphrose lipoïdique (1931).

Les malades présentent des œdèmes abondants et une albuminurie intense. L'examen histologique des reins montre des lésions particulières dont l'élément principal est une infiltration des tubuli par des substances lipoidiques sans lésion inflammatoire nette. Le sérum est très riche en lipides et pauvre en protéides, mais cette hyperlipémie est surtout manifeste pour la fraction albuminique qui peut contenir presque autant de lipides que de protéides.

Ces lipides sont cependant très stables à l'extraction éthérée.

Une analyse physico-chimique détaillée de la sérum - albumine des néphrosiques montre qu'elle contient des cénapses précipitables à $\text{pH} = 3,8$ comme chez les individus normaux et en quantité à peu près égale. Des cénapses acido - solubles très stables et faciles à séparer de la masse des albumines sont par contre caractéristiques du sérum des malades atteints de néphrose lipoidique.

MACHEBŒUF et SANDOR ont montré que le pouvoir tampon des protéides riches en lipides est nettement supérieur à celui des protéides normaux ; cette augmentation n'existe que du côté alcalin de l'isoélectrique des albumines, ce qui amène à penser qu'un groupement chimique lipidique de caractère basique (choline ?) intervient dans l'ionisation en milieu aqueux.

Or l'ionisation agit sur la tension osmotique des protéides du plasma qui a un rôle fondamental dans l'équilibre d'hydratation des tissus.

STARLING (1896) appela pression osmotique des protéides du sérum la différence de pression hydrostatique existant entre le sérum et une solution isoionique lorsque ces deux liquides, séparés par une membrane semi-perméable, sont parvenus à l'état d'équilibre. Il montra [41] l'influence sur les échanges d'eau et de sels à travers la paroi des capillaires sanguins du facteur physique qu'il venait de mettre en lumière.

GOVAERTS (1923-1925) étudiant les conditions physico-chimiques de l'apparition des œdèmes montra [42] qu'ils étaient dûs à l'existence au niveau des capillaires veineux

d'une pression hydrostatique supérieure à la pression osmotique des protéides plasmatiques.

Ainsi l'apparition des œdèmes peut résulter soit d'un accroissement de la pression capillaire veineuse (œdème de stase) soit d'une baisse de la teneur en protéides, amenant une diminution de la pression osmotique des protéides.

En réalité, dans le phénomène de STARLING, la pression totale paraît être la somme de trois facteurs qui sont :

- a) la pression osmotique,
- b) un équilibre de DONNAN,
- c) une pression d'imbibition.

L'équilibre de DONNAN représente environ le tiers de la pression totale. Il est dû, comme on le sait, à l'inégale répartition des ions diffusibles de part et d'autre de la paroi vasculaire jouant le rôle de membrane hémiperméable.

Cette concentration inégale des ions doit donner naissance à une différence de potentiel et à des forces osmotiques. Mais les protéides étant ionisés, cette pression osmotique dépend aussi de la nature des protéides et en particulier des lipides liés à ces albumines, comme l'a montré MACHEBŒUF [43]. Soumis à la dialyse, les albumines provenant du sérum de néphrose lipoïdique se diluent, à poids égal de protéides, plus que les albumines normales. Ainsi, par l'augmentation de la teneur en lipides, l'organisme peut, dans certains cas, réagir contre une baisse de la pression osmotique.

On comprend le rôle important que peuvent jouer les graisses dans le métabolisme de l'eau de l'organisme.

III. — *Nature des protéides entrant dans la constitution des cénapses lipoprotéidiques*

Certains auteurs considèrent que les cénapses (complexes) lipoprotéidiques résultent de l'adsorption des lipides par les protéides.

MACHEBŒUF reprenant ce travail avec Mme JANUSKIEWICZ (1937) donne de nouvelles preuves de la nature chimique des liens qui unissent ces principes immédiats dans le sérum sanguin [28].

Les auteurs préparent les albumines du sérum en précipitant les globulines par le sulfate d'ammonium à demi saturation.

En comparant la fraction acido-précipitable, la plus riche en lipides, à la fraction la plus soluble, pauvre en lipides, ils trouvent de grosses différences au point de vue solubilité, équilibre de membrane, point isoionique.

Chacune de ces deux fractions est alors délipidée sans dénaturer les protéides par la méthode de HARDY et GARDINER : toute différence a disparu.

Ce sont donc uniquement les lipides qui sont responsables des différences constatées ; leur union intime avec les protéides peut seule les expliquer quantitativement. Les auteurs montrent que les propriétés de complexes d'adsorption seraient très différentes de celles qu'on observe effectivement.

IV. — *Conclusions*

Ainsi les lipides ont une influence considérable sur l'état d'ionisation de l'eau. Il faut en conclure que les graisses du sérum et le milieu dispersant forment une phase unique. Etant insolubles dans l'eau, si les lipides étaient simplement dispersés mécaniquement dans le milieu aqueux, ils n'auraient aucune action sur son degré d'ionisation.

Les recherches précédemment citées font ressortir l'importance du rôle que jouent les lipides en physiologie et en pathologie, en particulier dans les processus qui régissent les échanges d'eau au niveau des tissus.

RECHERCHES SUR LA NATURE ET LA STABILITE DES LIAISONS
LIPIDES-PROTEIDES DANS LE SERUM SANGUIN

Nous avons vu que l'extraction des lipides sériques par l'éther était presque nulle. De nombreux auteurs (LEATHES, SHIMIDZU, HARDY et GARDINER, GRIGAUT, YOUNG, etc...) ont montré d'autre part qu'elle était nettement favorisée par l'alcool.

MACHEBŒUF et SANDOR [44] reprirent la question (1932). Leur but était d'étudier l'action combinée de l'éther et de l'alcool afin d'en tirer des renseignements sur la stabilité et si possible la nature des liaisons protéides-lipides dans le sérum sanguin.

Ils ont déterminé la quantité de graisses extraites du sérum par l'éther en présence de quantités d'alcool assez faibles pour que les protéides ne fussent pas dénaturés.

Technique :

Le procédé expérimental était le suivant :

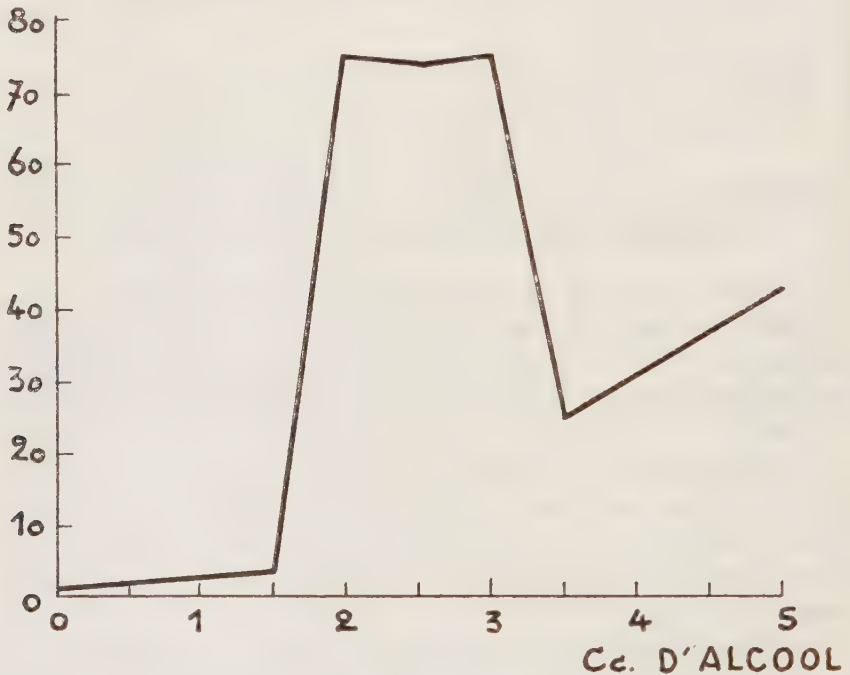
Dans une série d'ampoules à décanter, on introduit des volumes égaux de sérum et d'éther et des quantités d'alcool progressivement croissantes.

Après agitation légère, on laisse au repos un temps déterminé (5 heures), la couche éthérée est séparée, lavée à l'eau, recueillie dans une fiole tarée, évaporée à sec, placée dans le vide en présence d'acide sulfurique pendant plusieurs heures et pesée.

Résultats :

La quantité des lipides extraits à froid par l'éther en fonction de quantités croissantes d'alcool est d'abord voisine de celle qu'extrait l'éther seul, c'est-à-dire extrêmement fai-

MGR. DE LIPIDES EXTRAITS



ble. A partir d'une certaine teneur en alcool, elle augmente très brusquement jusqu'à une valeur maxima ; puis elle diminue à nouveau.

Ce phénomène est très général et peut être observé non seulement chez le cheval mais aussi chez le lapin, le mouton, l'homme. Mais les paramètres qui définissent les modalités de l'extraction présentent de grandes variations d'une espèce à l'autre et, à l'intérieur d'une même espèce, d'un animal à l'autre.

Les variations portent : sur l'ordonnée du maximum et sur l'abscisse du point d'inflexion de la courbe.

Les auteurs ont en outre précisé certains points importants :

1° La quantité d'éther n'intervient pas.

Il ne s'agit donc pas d'un phénomène de partage ; au contraire un excès d'éther peut amener la concentration de

l'alcool au-dessous de son optimum et l'extraction n'est plus complète.

2°) Tout ce qui est extractible passe dans l'éther au premier épuisement ; il ne reste dans la phase aqueuse que la petite quantité d'éther qui y est dissoute avec les lipides qu'elle a entraînés.

3°) La composition des lipides extraits est peu différente de celle des lipides totaux.

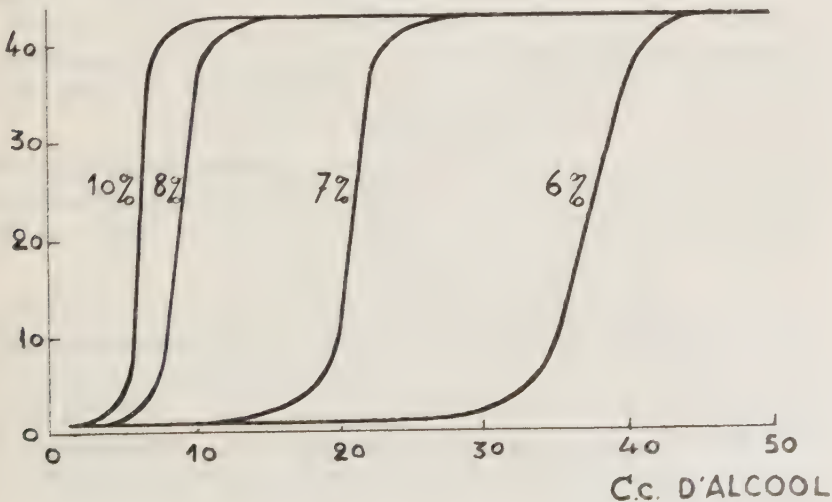
4°) L'extraction par l'éther à la concentration alcoolique optimale ne change pas la précipitabilité des protéides par le sulfate d'ammonium. Elle semble aussi ne pas dénaturer les protéides.

Extraction en fonction du temps :

L'extraction brusque des lipides à froid ne se produit qu'au bout d'un certain temps que les auteurs appellent *temps préparatoire* et qui est déterminé de la façon suivante :

On prépare un certain nombre d'ampoules à décanter de façon identique : dans chacune d'elles on introduit volumes égaux de sérum et d'éther et la quantité d'alcool correspondant à l'extraction optima. La phase éthérée est séparée après

MGR DE LIPIDES EXTRAITS



des temps de contact variables et les lipides qu'elle contient pesés dans les conditions déjà décrites.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Pendant un certain temps, l'extraction est presque nulle. Puis après un temps de contact bien déterminé (temps préparatoire) elle s'effectue très brusquement et atteint rapidement un maximum. Si l'on prolonge le contact, les quantités extraites restent les mêmes.

Si l'on fait varier la quantité d'alcool, le temps préparatoire varie également mais en sens inverse. Cependant, le maximum atteint reste toujours le même. Ceci n'est vrai qu'entre certaines limites de concentrations alcooliques : au-dessous d'une certaine limite elle ne se fait plus, au-dessus, elle provoque une dénaturation des protéides.

Les auteurs admettent que les lipides extraits à froid dans les conditions optimales représentent environ 50 % des lipides totaux.

Discussion des résultats et conclusions théoriques :

Ainsi, en présence de petites quantités d'alcool, l'éther peut libérer une proportion très notable des lipides du sérum alors que seul il n'en extrait que des quantités infimes.

L'examen des courbes d'extraction en fonction du temps de contact entre les deux phases montre que, pendant un certain temps (temps préparatoire) l'alcool semble ne pas intervenir ; puis l'extraction se fait brusquement et, une fois amorcée, évolue rapidement jusqu'à son terme.

Les auteurs ne retiennent pas l'hypothèse de l'alcoolyse lente des lipoprotéides avec mise en liberté des graisses et cherchent à expliquer les faits par une théorie basée sur les conceptions de LANGMUIR et de HARKINS.

Les constituants des micelles lipoprotéïdiques sont des corps à fonction chimiques diverses : acide, amine, amide, alcool, phénol, cétone, ester... ; leurs groupements fonctionnels ont tous une affinité notable pour l'eau ; d'autre part les chaînes polyméthyléniques, acycliques ou cycliques qu'ils renferment sont hydrophobes mais présentent une affinité réciproque considérable.

On peut admettre que les groupements hydrophiles sont orientés à l'extérieur des micelles vers la phase aqueuse et plus ou moins hydratés. Les groupements « carbure d'hydrogène », appelés encore *éléiques*, par lesquels se fait la liaison des lipides aux protéides sont orientés vers l'intérieur. Entre eux et l'extérieur de la micelle est donc interposée une zone d'hydratation qui est difficilement pénétrable par l'éther ; c'est elle qui protégerait les lipides contre l'action de ce solvant.

L'alcool a pour effet de modifier progressivement la nature de celui-ci et l'affinité des diverses fonctions pour ce solvant. Il modifie en outre l'état d'ionisation et d'hydratation des diverses fonctions des protéides. La zone protectrice se modifie peu à peu et les groupements *éléiques* deviennent accessibles à l'éther.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — TERROINE (E. F.) : Contribution à la connaissance de la physiologie des substances grasses et lipoidiques.
Ann. Sc. nat. zool., 1919, s. 40, 4 n° 1, 397.
- 2 — TERROINE (E. F.), BRECKMANN et FEUERBACH : La composition globale des organismes dans les carences et surcharges diverses, inanition, etc..
Arch. intern. Physiol., 1924, 22, 235.
- 3 — VALLA (Mlle S.) : La physiologie des lipides et des stérols dans l'inanition complète et l'inanition protéique.
Bull. Soc. Chim. biol., 1935, 17, 1715.
- 4 — HOPPE SEYLER : *Med. chem. Untersuchungen*, Berlin 1866.
- 5 — LIEBERMANN : *Arch. für die gesammte Physiologie*, 1938, 54, 573.
- 6 — DORMAYER : *Plügers Arch.*, 1896, 65, 90.
- 7 — ERLANDSEN : *Zeitschrift f. physiol. Chem.*, 1907, 51, 71.
- 8 — EANG : *Ergebnisse d. Physiol.*, 1909, 8, 463.

- 9 — LUMIERE (A.) : *Revue générale des colloïdes*, 1925, 3, 8.
- 10 — CIACCIO : *Boll. della Societa di Biol. sperim.*, 1926, 1, 144.
- 11 — HANSTEEN CRANNER . *Ber. d. botan. Ges.*, 1919, 37, 380.
- 12 — MACHEBŒUF (M.), LEVY (Mme G.) et FAURE (Mlle M.) : Recherches sur la nature chimique de l'haptène fixateur lipodique des bacilles tuberculeux tués par la chaleur.
C. R. Ac. Sc., 1935, 200, 1547.
- 13 — PRZYLECKI (St. J. von), KASPRZYK et RAFALOWSKA :
Voir : Untersuchungen über Polysaccharoproteide.
Bioch. Zeitschr., 1936, 286, 360.

PRZYLECKI (St. J. von) et HOFER : Untersuchungen über künstliche « Lipoproteide ».
Bioch. Zeitschr., 1936, 288, 303.
- 14 — LÉCOMTE DU NOÛY (P.) : Equilibres superficiels des solutions colloïdales.
Paris, Masson, 1 vol. (1929).
- 15 — MACHEBŒUF (M.) et WAHL : Recherches biologiques sur la néphrose lipodique. Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 736.
- 16 — NEUSCHLOSZ (M. S.) : *Biochem. Zeitsch.*, 1930, 225, 115.
- 17 — HARDY (W. B.) : Colloïdal solution. The globulins.
Journ. of. Physiol., 1905, 33, 251.
- 18 — HASLAM (H. C.) : *The biochem. journ.*, 1913, 7, 492.
- 19 — HANDOWSKY et WAGNER : Ueber einiege physialisch-chemische Eigenschaften von Lecithine emulsion und Lecithine eiweissmischungen.
Bioch. Zeitschrift, 1911, 26, 32.
- 20 — CHICK (Mme H.) : The apparent formation of euglobulin from pseudoglobulin and a suggestion as to the relationship beetwen these two proteins in serum.
Bioch. journ., 1914, 8, 404.
- 21 — KUMAGAWA (M.) et SUTO (K) : Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren substanzen in tierischen material..
Bioch. Zeitsch., 1908, 8, 477.
- 22 — LEATHES (J. B.) : A lecture on the fractions of the liver in relation to the metabolism of fats.
The lancet., Fev. 1909.

- 23 — SHIMIDZU (Y.) : Ein Beitrag zur Kumagawa-Sutoschen Fettbestimmungsmethode.
Bioch. Zeitschr., 1910, 28, 237.
- 24 — GRIGAUT (A.) : Méthode de dosage de la cholestérine dans le sérum et dans les tissus. Procédé colorimétrique.
C. R. Soc. Biol., 1911, 71, 523.
- 25 — GRIGAUT (A.) : Les « protéocholestérides » du sérum et leur dédoublement en vue de l'extraction totale de la cholestérine.
C. R. Soc. Biol., 1912, 72, 912.
- 26 — HARDY (W. B.) et GARDINER (Mme S.) : *Journ. of Physiology.*, 1910, 40, 68.
- 27 — SORESENSEN (S. P. L.) : Studies on proteins. *C. R. lab. Carlsberg*, 1925, 15, n° 11.
- 28 — MACHEBŒUF (M.) et JANUSKIEWIEZ (Mme M.) : Etudes sur les cénapses lipido-protéïdiques du sérum sanguin. Nature des protéïdes entrant dans la constitution de ces cénapses.
Bull. Soc. Chim. biol., 1937, 19, 694.
- 29 — YOUNG (E. G.) : On the optical power of crystalline ovalbumin and serum albumin.
Proc. of Royal Soc. London, 1922, S. B., 93, 15.
- 30 — HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE : Untersuchungen über der Zustand des Cholesterins im Blutserum.
Pflüger's Arch., 1925, 210, 63.
- 31 — BOSSE (P.) : Untersuchungen über die Zusammensetzungen des Blutserums und ihre Bedeutung für Giftwirkungen. Die Wirkung von Ather auf Sérum.
Pflüger's Arch., 1925, 210, 56.
- 32 — TROENSEGAARD et KOUDAHL : Cholesterin als prostetische Gruppe in Serumglobulin.
Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. ges. phys. Chem., 1926, 153, 3 et 111.
- 33 — GARDNER et GAINSBOROUGH : Sterols and proteins.
Bioch. journ., 1927, 21, 130.
- 34 — FRANKENTHAL (K.) : *Zeitschr. f. Immunitätsforsch u. exp. Therap.*, 1925, 42, 501.
- 35 — WOLFF (E. H.) et FRANKENTHAL (K.) : *Krankheitsforsch.*, 1925, 1, 445.
- 36 — MELLANDER (O.) : *Bioch. Zeitschr.*, 1935, 277, 305.

- 37 — THEORELL (H.) : *Bioch. Zeitschr.*, 1934, 275, 1.
- 38 — MACHEBŒUF (M.) : Recherches sur les lipides, les stérols et les protéides du sérum et du plasma sanguins.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1929, 11, 268 et 485.
- 39 — MACHEBŒUF (M.) : Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique.
Paris, Hermann, 1 vol. (1936).
- 40 — MACHEBŒUF (M.) et WAHL (R.) : Recherches biologiques sur la néphrose lipéidique.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 486, 511 et 736.
MACHEBŒUF (M.), WAHL (R.) et SANDOR (G.) : Recherches biologiques sur la néphrose lipéidique.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 504.
MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.) : Recherches biologiques sur la néphrose lipéidique.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 745.
- 41 — STARLING (E. H.) : *Journ. of. Physiol.*, 1896, 19, 312.
- 42 — GOVAERTS (P.) : Recherches sur la pression osmotique des protéines du sérum.
C. R. Soc. Biol., 1923, 89, 678 et 680.
C. R. Soc. Biol., 1924, 91, 116.
C. R. Soc. Biol., 1925, 93, 441.
- 43 — MACHEBŒUF (M.) : Recherches sur le rôle des lipides et des protéides sanguins dans les échanges d'eau de l'organisme.
C. R. Ac. Sc., 1931, 191, 1413.
- 44 — MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.) : Recherches sur la nature et la stabilité des liaisons protéides-lipides du sérum sanguin. Etude de l'extraction des lipides par l'éther en présence d'alcool.
Bull. Soc. Chim. biol., 1932, 14, 1168.
-

CHAPITRE IV

SUR LA NATURE DES FORCES QUI INTERVIENNENT DANS LA CONSTITUTION DE LA MATIÈRE VIVANTE

La stabilité du système lipoprotéidique du sérum sanguin fait l'objet de la majeure partie du travail que nous allons exposer. Il convient donc de préciser la structure de cet édifice physico-chimique et la nature des forces qui unissent les atomes et les principes immédiats qui entrent dans sa constitution.

Les protéides du protoplasma animal ou végétal sont parfois appelés « Colloïdes biologiques ».

La conception de GRAHAM (1861) d'un état particulier de la matière, l'état colloïdal, avait fait naître de grands espoirs. Elle fut le point de départ de recherches fécondes, mais servit aussi bien souvent à masquer notre ignorance de la nature et des propriétés de la matière vivante et vint fort opportunément se substituer à la conception métaphysique de la « force vitale » battue en brèche de trop de côtés à la fois.

Il y a, d'après GRAHAM, deux différences essentielles entre les colloïdes et les cristalloïdes : l'une relative à la diffu-

sion à travers les membranes, l'autre à la tendance à former des agrégats dans les solutions.

Les caractéristiques de l'état colloïdal basées sur la diffusion ont le double avantage de permettre l'analyse mathématique du phénomène et d'être basée sur des faits constatables et mesurables.

ZSIGMONDY [1] propose de ranger toutes les solutions depuis les suspensions grossières jusqu'aux solutions vraies dans une série continue en ne tenant compte que de la taille des particules.

L'autre définition est basée sur l'état d'agrégation et peut s'énoncer ainsi :

Dans une solution vraie, ce sont les molécules (et les ions dans le cas des électrolytes) qui sont dispersés dans le solvant ; la substance est dite cristalloïde. Dans une « fausse solution » les particules en suspension dans le milieu dispersant sont des agrégats moléculaires.

Il est de notion banale aujourd'hui qu'il n'existe pas de substances colloïdes ou cristalloïdes et que beaucoup d'entre elles peuvent prendre l'un ou l'autre état suivant les conditions (en particulier le solvant).

Ainsi les sels alcalins d'acides gras (stéarate, oléate) se dissolvent dans l'alcool à l'état cristalloïde avec des poids moléculaires normaux et dans l'eau à l'état colloïdal. L'inverse se produit pour le sel marin.

La définition de ZSIGMONDY est incontestablement plus rationnelle. L'analyse des forces dispersives est assez subtile et souvent illusoire ; elle est encore du domaine théorique. Le chimiste préfère les définitions basées sur des données mesurables.

Il nous faut tout de même exposer dans leurs grandes lignes les idées des auteurs qui ont essayé de faire l'analyse des forces intervenant dans la constitution de la matière vivante.

Avant d'exposer la représentation qu'on peut se faire de ces forces, nous dirons qu'il ne faut accepter qu'avec beaucoup de prudence les théories qui ont été émises.

La plupart émanent de physiciens (WERNER, LANGMUIR, HARKINS). Chacun d'eux a attribué aux phénomènes qui avaient retenu son attention une importance particulière. Dans ces diverses théories les appellations communes n'ont pas toujours la même acception ; d'où une certaine confusion. D'autre part, les biologistes qui ont voulu transposer ces notions dans leur science (J. LÖB en particulier) se sont fait de ces forces une conception personnelle, adaptée aux phénomènes biologiques, mais un peu différente de la théorie physique initiale.

On peut distinguer des *forces physiques* et des *forces chimiques*. Les premières interviennent dans des phénomènes tels que la dissolution, l'évaporation, la cristallisation, les forces capillaires. Leur rayon d'action dépasse largement les diamètres moléculaires ; elles décroissent en raison inverse du carré des distances.

Les forces chimiques seaturent entre atomes ; leur champ est limité à la sphère d'action des atomes. Elles interviennent dans les réactions chimiques proprement dites. Ces forces peuvent être de deux sortes.

Il y a d'abord les forces dites de *valence primaire*. Elles correspondent à la valence électrochimique des éléments et s'expriment numériquement par la capacité de combinaison à l'hydrogène, énergie mise en jeu dans l'électrolyse et mesurée par les lois de FARADAY. J. LÖB leur rattache les combinaisons des acides et des bases avec les protéïdes.

Mais cette valence est très variable (exemple du fer, du manganèse, de l'azote, etc...) et dépend de la nature des éléments ou radicaux entrant en combinaison. L'atome ou le radical n'a pas épuisé sa capacité réactionnelle et les champs de force qui subsistent sont appelés forces de *valence secondaire*. L'ensemble de la valence primaire et secondaire constitue la *valence maximale* ou *nombre de coordination* de WERNER. Ce savant a illustré sa théorie par l'exemple des combinaisons du cobalt avec les radicaux NH_3 et NO_2 .

Pour LANGMUIR [2], la valence secondaire représenterait les champs de forces qui subsistent après saturation de la valence primaire. Elle serait de nature chimique et déterminerait des phénomènes doués de spécificité comme l'absorption,

la dissolution, l'évaporation, les états solide et liquide. Dans les solutions, elle mesure l'affinité qui attire les unes vers les autres les molécules du corps dissous et celles du solvant.

J. LœB [3] ne considère pas les forces chimiques et physiques comme étant de nature essentiellement différente. Si les forces qui attirent les unes vers les autres les molécules du corps dissous et celles du solvant deviennent trop petites, la solution tend vers l'instabilité. Les molécules du corps dissous sont attirées l'une vers l'autre et il se constitue des agrégats : on a une solution colloïdale.

Ces granules ne pourront être maintenus en suspension que par des forces purement physiques de répulsion électrostatique dues à l'existence d'une double couche électrique à la surface de séparation entre chaque granule et le liquide dispersant.

Dans l'idée de J. LœB, la couche électrique double caractérise les fausses solutions tandis que dans les solutions vraies les molécules du corps dissous sont liées à celles du solvant par une affinité purement chimique (force de valence secondaire).

« Nous pouvons maintenant nous demander, écrit (*) J. LœB [3], laquelle des deux forces, répulsion électrique ou force de valence secondaire maintient en solution les protéines vraies dans l'eau. La solution de ce problème peut s'obtenir au moyen du critérium suivant : si les forces qui maintiennent une protéine en solution sont des forces d'attraction entre molécules du solvant et du dissous (c'est-à-dire des forces de valence secondaire, telles que les définit LANGMUIR), de fortes concentrations salines sont nécessaires pour obtenir la précipitation, et le signe de la charge de l'ion précipitant n'a aucune relation avec celui des particules de protéine. Si au contraire ces forces sont petites, les particules peuvent néanmoins rester en suspension grâce à la couche électrique double qui entoure chaque particule ; mais dans ce cas de faibles concentrations salines suffisent à précipiter la protéine et l'ion actif du sel porte une charge opposée à celle des particules de la protéine. Si on applique ce critérium aux solu-

(*) J. LœB. Les protéines. Trad. H. Mouton. Pages 20-21.

tions de protéine, on trouve que certaines d'entre elles, comme l'albumine dénaturée, sont maintenues en suspension colloïdale par des couches électriques doubles, tandis que certaines autres, comme l'albumine cristallisée non dénaturée ou la gélatine, sont maintenues en solution par les mêmes forces qui déterminent la stabilité des solutions cristalloïdes ».

Ainsi, d'après cet auteur ce sont des forces de valence secondaire qui maintiennent en solution les protéides du sérum qui ainsi se rapprocheraient plus par leurs propriétés (réactions chimiques, solubilité) des cristalloïdes que des colloïdes.

Cependant, nous avons vu que les protéides sont souvent appelés « Colloïdes biologiques ». La raison de cette appellation est la suivante : Les protéides se comportent comme des colloïdes au point de vue de l'action des électrolytes sur quatre propriétés qui sont : le potentiel de membrane, la pression osmotique, le gonflement, la viscosité (J. LÆB).

Voici quels sont les faits :

Il existe un minimum de la grandeur de ces propriétés pour un pH bien déterminé. Cette influence dépend uniquement de la valence et non de la nature chimique de l'anion ou du cation mis en jeu. L'addition d'un sel neutre à une solution de protéides abaisse la valeur des quatre propriétés et cette influence augmente avec la valence de celui des ions qui a le signe contraire de l'ion protéide.

Les amino-acides et d'autres cristalloïdes ne réagissent pas ainsi aux électrolytes. DONNAN puis LÆB ont montré que ce comportement spécial de l'ion protéide est dû uniquement à sa grosseur anormale qui fait qu'il ne peut diffuser aisément à travers des membranes ou gels perméables aux ions plus petits. De chaque côté d'une telle barrière, la concentration des ions diffusibles à l'équilibre est différente et DONNAN a montré que c'est dans ce fait qu'on devait rechercher l'unique cause de l'influence particulière des électrolytes sur les protéides.

*
**

Ainsi la couche électrique double caractérise les fausses solutions tandis que dans les solutions vraies les molécules

du corps dissous sont liées aux molécules du solvant par une affinité purement chimique. Les protéides à ce point de vue se comportent comme des cristalloïdes.

L'existence d'un feuillet électrique à la surface de séparation de la micelle et du milieu ambiant est souvent un phénomène secondaire provoqué par un agent chimique. Des ions détachés de la molécule restent adsorbés à sa surface et produisent avec elle la couche électrique double. Ces ions peuvent d'ailleurs être remplacés par d'autres suivant la loi des proportions définies. C'est ce qui a lieu dans l'action du sulfate de potassium sur l'hydrosol d'hydrate ferrique. Un ion SO_4^- peut remplacer deux ions Cl^- .

Et puis des différences aussi tranchées entre forces physiques et forces chimiques ne sont plus très admises aujourd'hui. Tous les degrés d'attraction moléculaire existent des réactions chimiques vraies aux phénomène dits d'adsorption.

MICHAELIS [4] en donne l'exemple suivant (*) :

« Nous sommes en face de la difficulté d'être obligés d'appeler adsorption l'attraction du bleu de méthylène pour le charbon et de tenir pour non adsorption l'attraction du bleu de méthylène par le kaolin. De plus, dans le cas du charbon nous ne pourrions pas du tout établir l'équation chimique de la réaction tandis qu'avec le kaolin la substitution réelle du calcium et des ions analogues par les ions du bleu de méthylène a été démontrée. Celle-ci est sûrement une réaction généralement admise comme chimique. Mais en même temps, il n'est pas permis d'exclure la combinaison du kaolin avec le bleu de méthylène du groupe des processus d'adsorption ».

Tout ceci fait ressortir des transitions graduelles. Quoiqu'il en soit, les différents groupes de forces dont nous avons rappelé la définition et les caractères doivent subsister parce qu'ils sont pratiques ; l'existence de termes intermédiaires ne justifie pas le rejet d'un essai de systématique.

Examinons maintenant comment on peut se représenter la micelle lipoprotéidique.

(*) L. MICHAELIS. In R. H. BOGUE. Traité de Chimie colloïdale. Trad. J. Barbaudy. Tome I. Page 226.

Les constituants élémentaires sont les acides aminés. Ils s'unissent entre eux par des forces de valence primaire pour former les polypeptides. Des polypeptides s'unissent à d'autres polypeptides et à des lipides par des forces de valence secondaire. Le système lipoprotéidique ainsi formé est orienté comme nous l'avons rappelé : les groupements polaires s'orientent partout vers les molécules d'eau et stabilisent le système, les groupements éleiques vers l'intérieur des micelles.

D'autres propriétés de la micelle lipoprotéidique ont été dégagées par SANDOR [5].

C'est d'abord sa « rigidité de constitution » ; les modifications ne se produisent pas du tout dans un certain domaine. Une fois qu'une certaine limite est dépassée elles s'effectuent rapidement et jusqu'à leur terme. L'auteur cite une image : un solide sans élasticité résiste complètement à un effort mécanique d'intensité croissante jusqu'au moment où il casse brusquement.

Cette constitution rigide serait liée à une structure pseudo-cristalline qui prendrait naissance au cours de la synthèse des micelles ; le squelette serait constitué par les chaînes de valence primaire (polypeptides et lipides) unies suivant un schéma géométrique déterminé. Cette structure pourrait aussi dépendre des facteurs physiques et chimiques extérieurs, ceux-là même qui régissent les échanges protoplasmiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — ZIGMONDY : *Kolloid chemie*, vol. I Leipzig, (1925). P. 117.
- 2 — LANGMUIR (L.) : *J. of. amer. chem. Soc.*, 1916, **38**, 2221.
- 3 — LOEB (J.) : Les protéines. Trad. H. Mouton. Paris, *Alcan*, 1 vol. (1924).
La théorie des phénomènes colloïdaux. Paris, *Alcan*, 1 vol. (1925).
- 4 — MICHAELIS (L.) : Adsorption et catalyse. In BOGUE (R. H.). *Traité de chimie colloïdale*. Trad. J. Barbaudy, Paris, *Hermann*, 2 vol. (1928, 1930).
- 5 — SANDOR (G.) : Le problème des protéides, Paris, *Doin*, 1 vol. (1933).

TROISIÈME PARTIE

LA STABILITÉ DU SYSTÈME LIPOPROTÉIDIQUE DU SERUM

CHAPITRE I

INFLUENCE DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES SUR L'EXTRACTIBILITÉ DES LIPIDES SÉRIQUES

Les *protéides naturels* (*) sont les représentants les plus caractéristiques de la matière vivante. Ceux du sérum sanguin sont le support des propriétés biologiques essentielles du plasma circulant. On comprend l'intérêt capital qui s'attache à la connaissance de leur structure et aux modifications que subit celle-ci sous l'influence des facteurs physiologiques et au cours des états pathologiques.

Mais ces problèmes, très complexes, ont presque toujours été abordés indirectement.

C'est le cas pour tous ceux qui font l'objet de l'Immunologie. S'il est parfaitement inutile de souligner l'immense

(*) On peut définir le concept de **proteide naturel** déjà employé par certains auteurs (Voy. G. SANDOR. Le problème des protéides. 1. vol. Doin (1933) de la façon suivante :

Un protéide est un principe immédiat défini en chimie biologique par quelques caractères physiques mais surtout par ses propriétés chimiques. C'est avant tout une entité chimique.

L'expression *protéide naturel* désigne les substances qu'on obtient par les procédés physiques habituels de séparation des protéides (précipitation saline, acidification, etc...) et qui contiennent à la fois des protéides et des lipides, éventuellement des glucides. Cette définition, synonyme de l'expression *biocénapse* créée par MACHEBŒUF, est essentiellement physiologique.

intérêt de cette science, il faut toutefois noter qu'elle utilise des réactions dont le mécanisme physico-chimique reste très obscur.

Le sérum réagit à l'introduction dans l'organisme de substances protéidiques qui lui sont étrangères en modifiant son comportement vis à vis de celles-ci. Nous ignorons la nature de ces modifications. Nous ne connaissons leur existence que par les nombreux tests qui servent à les déceler (réactions de fixation, d'agglutination, sensibilisation, pouvoir préventif, etc...).

Ce qui fait l'intérêt pratique de ces réactions c'est leur spécificité généralement très élevée (*). Mais elles nous laissent dans l'ignorance des modifications effectives qu'ont subi les protéides naturels.

Indirectes aussi sont les recherches d'ordre chimique par lesquelles on s'efforce de déterminer les répercussions sur le sérum des influences auxquelles l'organisme a été soumis. Les modifications que l'on peut mettre en évidence portent généralement sur les produits du métabolisme de l'être vivant (urée, acide urique, glucose, cholestérol, etc...). Quant aux lipides et aux protéides leur taux varie quelquefois, mais bien souvent il reste inchangé au cours de processus qui altèrent profondément leur structure, dans certaines maladies graves par exemple.

La méthode chimique ne nous livre en effet que des substances dénaturées, artificiellement isolées de la matière vivante et ne peut nous renseigner sur leurs aptitudes réactionnelles, leur stabilité, leur mobilité, les relations qu'elles contractent avec ses autres constituants.

Pour essayer de connaître la structure de ces édifices complexes, on pourra les soumettre à des forces d'intensité progressivement croissante.

Le domaine de stabilité de la micelle lipoprotéidique nous indiquera le mode de liaison des principes immédiats

(*) L'exception la plus importante à la réponse spécifique de la production d'anticorps par un antigène déterminé est le groupe des antigènes hétérogéniques découverts par FORSMANN en 1911. On peut obtenir un sérum hémolytique d'un titre très élevé contre les hématies de mouton en injectant au lapin un broyage de rein de cobaye. De tels exemples sont actuellement très nombreux.

constitutifs entre eux. Les variations de l'énergie mise en jeu sous les influences physiologiques et pathologiques nous apprendront par quels processus physico-chimiques le tissu sanguin répond à ces perturbations de son équilibre.

Nous montrerons au cours de cet exposé tout l'intérêt des recherches tentées dans cette voie.

*
**

Partant des résultats, précédemment exposés, de MACHE-BŒUF et SANDOR [1], nous nous sommes demandés si la courbe d'extraction des lipides sériques pouvait définir la stabilité du système lipoprotéidique d'un sérum déterminé.

Autrement dit, nous avons désiré savoir si l'aspect de cette courbe pouvait caractériser le sérum examiné et dans quelle mesure intervenait l'alcool dont le rôle est précisément de détruire en partie les liaisons lipides-protéides et de permettre la dissolution dans l'éther des graisses libérées.

Laissant constants les facteurs physiques, en particulier la température et le temps de contact entre les phases sérique et éthérée, nous avons étudié (1934) l'évolution du système ternaire (sérum, éther, substance), divers alcools et des composés à fonction chimique voisine étant substitués à l'éthanol [2].

L'influence sur l'extractibilité des lipides sériques des ions H^+ et OH^- a fait l'objet d'une étude spéciale [3] (1936).

TECHNIQUE

Dans la suite de ce travail, nous appellerons *lipides extraits à froid* (il s'agit plus exactement d'un extrait lipoïdique) les substances obtenues ainsi :

Dans une série d'ampoules à décanter de 250 cc. on introduit 25 cc. de sérum, 25 cc. d'éther et n cc. d'alcool éthylique à 96° (n est généralement compris entre 0 et 6). On agite une première fois assez énergiquement pendant une dizaine de secondes de façon à obtenir une émulsion fine et un contact aussi parfait que possible entre le sérum et l'éther.

Après cette première agitation, les phases sérique et éthérée se séparent toujours sans qu'il y ait formation d'émulsion.

On laisse quinze heures à la température du laboratoire, les ampoules reposant directement sur la table (*). Au bout de ce temps, une deuxième agitation est faite ; celle-ci doit être effectuée avec précaution quand on arrive aux ampoules contenant 3 cc. d'alcool et plus. L'ampoule est placée sur un support ; la couche sérique est soutirée et la couche éthérée lavée avec 2 cc. d'eau distillée qu'on laisse couler le long des parois. L'eau est alors soutirée lentement et en plusieurs fois pour ne pas entraîner d'éther ; celui-ci est transvasé quantitativement dans une fiole de FOURNEAU tarée de 60 cc, l'ampoule étant rincée avec quelques centimètres cubes d'éther. On évapore à basse température (**) et on sèche 8 heures à 50° (***). Au sortir de l'étuve, les fioles sont placées dans un exsiccateur à acide sulfurique où l'on fait le vide. Après 15 à 20 heures, l'extrait bien sec est repris par l'éther anhydre, filtré aussi rapidement que possible sur papier filtre dégraissé ou mieux sur amiante en s'aidant d'une légère dépression au moyen de la trompe à eau. On évapore à nouveau, on sèche pendant 1 heure à 50° et on pèse après avoir laissé la fiole de FOURNEAU pendant 15 à 20 heures dans le vide en présence d'acide sulfurique.

Toute la verrerie employée est soigneusement nettoyée au mélange sulfo-chromique chaud.

SUBSTANCES ETUDIEES

Notre étude de système ternaire (sérum-éther-substance) comportait donc l'examen comparatif de l'éthanol et de substances organiques ou minérales, les unes à fonction chimique identique, les autres notablement différentes.

(*) Si l'ampoule est maintenue verticalement à l'aide d'un support, la surface de séparation est plus petite, mais la quantité de lipides extraite est la même, comme nous l'avons vérifié à plusieurs reprises.

(**) Pratiquement nous laissons pendant toute la nuit la fiole de FOURNEAU sur l'étuve à 50°.

(***) Sans entrer dans la discussion de cette technique, rappelons que dans ces conditions le poids de l'insaponifiable total n'est pas modifié et que l'augmentation de poids due à l'oxydation des acides gras non saturés pendant ce laps de temps est tout à fait insignifiante. (Voy. LEMELAND Bull. Soc. Chim. 1922, 4, 300).

Les composés que nous avons étudiés sont les suivants :

Les premiers alcools primaires de la série acyclique : les alcools méthylique, éthylique, propylique, butylique, et isoamylique.

Un alcool secondaire de la série cyclique : le cyclohexanol.

Un dialcool : le glycol éthylénique.

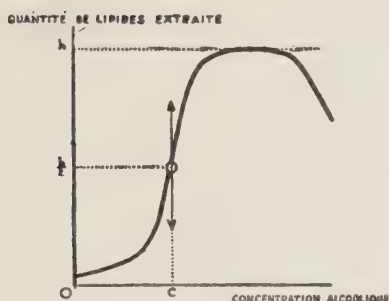
Deux aldéhydes : les aldéhydes formique et éthylique.

Une cétone : l'acétone ordinaire.

L'acide sulfurique $\frac{N}{I}$

La soude $\frac{N}{I}$

Caractéristiques de la courbe d'extractibilité



Les caractéristiques principales de la courbe d'extractibilité sont les suivantes :

Ordonnée du plateau.

Elle représente la valeur du maximum de lipides extrait.

MACHEBŒUF et SANDOR

ont montré qu'elle varie d'un sérum à l'autre [1].

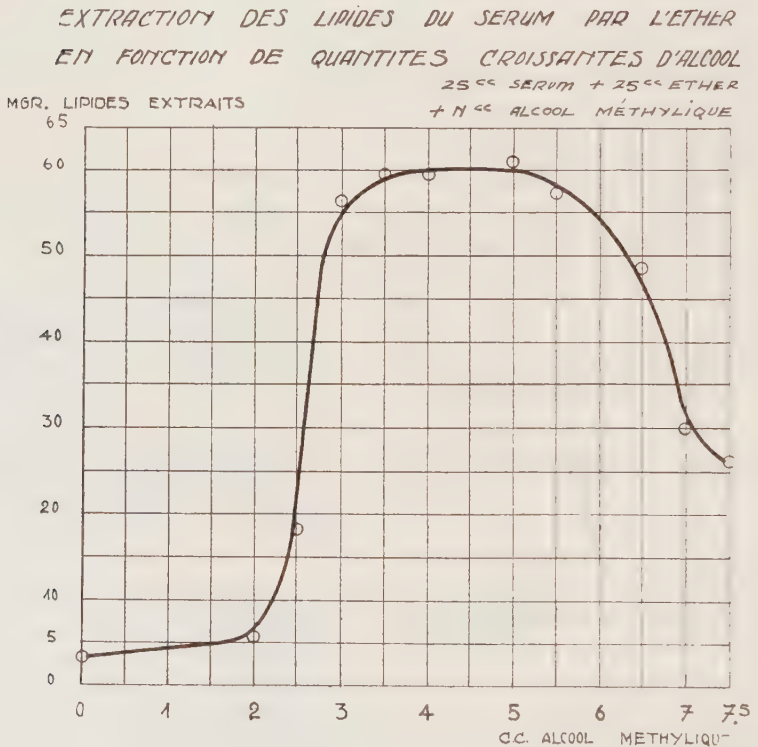
Concentration critique. — La montée brusque de la courbe peut être définie par le point d'inflexion de celle-ci. L'abscisse du point de cette courbe qui correspond à la moitié de l'ordonnée du plateau la définit pratiquement avec une très suffisante exactitude. Nous l'appellerons *concentration critique*.

Ainsi pour la courbe représentative des lipides extraits par l'éther en fonction de petites quantités d'alcool méthylique que nous donnons ci-dessous, l'ordonnée du plateau a pour valeur 60 mgr. L'abscisse correspondant à 30 mgr. est 2,6. La concentration méthylalcoolique critique est donc 2 cc, 6.

(Les chiffres ainsi obtenus peuvent toujours être comparés entre eux car ils correspondent à des quantités fixes et égales (25 cc) de sérum et d'éther).

Résultats obtenus

La représentation graphique des quantités de lipides extraites par l'éther en fonction de chacune des substances étudiées, présente deux aspects caractéristiques qui permettent de les répartir en deux groupes foncièrement différents [2] :



1° Certains de ces composés se comportent comme l'alcool éthylique, c'est-à-dire que leur adjonction au mélange (sérum + éther) augmente considérablement l'extraction dès que leur concentration atteint une certaine valeur.

2° D'autres n'ont aucun effet analogue, c'est-à-dire que leur introduction dans le mélange (sérum + éther) ne modifie pas l'extraction.

I

SUBSTANCES FAVORISANT L'EXTRACTION DES LIPIDES
PAR L'ETHER

Ces substances forment un premier groupe constitué par :

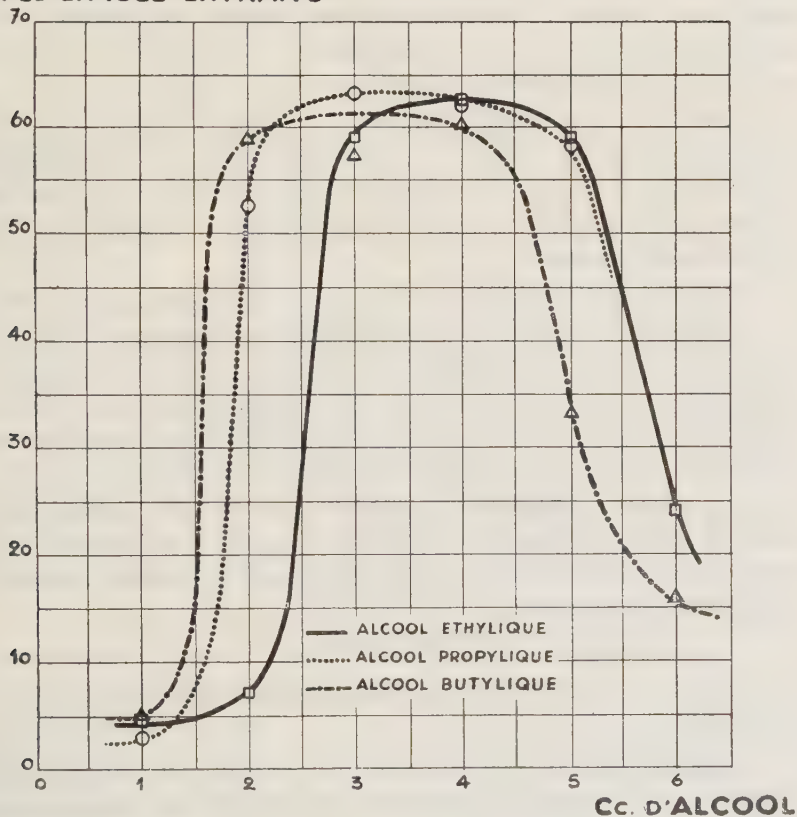
Les cinq alcools primaires acycliques étudiés ;

Le cyclohexanol ;

L'acétone.

Au point de vue qualitatif, le phénomène se présente de la même manière pour toutes; la quantité de lipides extraite, d'abord très faible comme en présence d'éther seul, croît brus-

MGR. DE LIPIDES EXTRAITS



quement jusqu'à un maximum dès que la concentration de la substance dans le mélange (sérum + éther) atteint une certaine valeur; ensuite, elle diminue.

Au point de vue quantitatif, il y a lieu d'examiner les paramètres de la courbe d'extractibilité.

Les différentes substances que nous avons étudiées peuvent être classées ainsi d'après la valeur croissante de leur concentration critique :

Alcools propylique et butylique ;
Alcools éthylique et isoamylique ; cyclohexanol ;
Alcool méthylique ;
Acétone.

Ainsi, les alcools propylique et butylique ont sur l'extraction une action favorisant plus considérable que l'alcool éthylique ; celui-ci se montre à peu près comparable à l'alcool isoamylique et au cyclohexanol, mais il est plus actif que l'alcool méthylique et surtout que l'acétone.

Tandis que la concentration critique se montre variable d'une substance à l'autre, les plateaux sont très sensiblement les mêmes pour tous ces composés qui diffèrent par leurs propriétés physiques, par leur composition et même par leurs caractères chimiques.

Il faut noter qu'assez souvent — mais non régulièrement — le plateau de l'alcool méthylique est inférieur de 5 à 15 % à celui de l'alcool éthylique. Le premier terme de la série alcoolique auquel la proximité des groupements — CH_3 et — OH confère par ailleurs des propriétés assez particulières, se distingue ainsi de ses homologues supérieurs.

La concentration critique de l'acétone, est, comme nous l'avons dit, supérieure à celle des alcools. La montée de la courbe est aussi plus progressive, mais le plateau atteint est sensiblement le même.

Conclusions :

Quelles conclusions peut-on dégager de ces premiers résultats ?

Chaque courbe d'extractibilité présente un élément qui dépend de la substance employée et de l'activité de son action sur les liaisons lipides-protéides : c'est la concentration cri-

tique. Mais chacune d'elles présente aussi un élément indépendant de l'adjuvant puisque toutes ont un plateau commun. *Ce plateau est donc caractéristique d'un sérum déterminé* comme l'établissent les chiffres que nous avons obtenus.

Il n'y a pas de relation entre le déclenchement plus ou moins rapide du phénomène d'extraction et la concentration moléculaire de la substance dans le milieu. Mais, une fois amorcée, l'extraction évolue rapidement jusqu'à un terme qui est le même pour tous ces composés.

TABLEAU I

Volume ajouté	0 cc.	1 cc.	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.
Alc. méthylique	4.0	4.0	5.6	6.2	96.2	90.8	84.4
Alc. éthylique		3.4	7.1	93.6	100.2	107.4	55.0
Alc. isoamylique		5.0	8.4	98.8	98.6	100.4	99.6

TABLEAU II

Volume ajouté	0 cc.	1 cc.	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.
Alc. méthylique	3.5	3.6	5.1	7.7	30.1	46.5	56.5
Alc. éthylique		4.8	7.1	58.9	62.2	58.8	24.0
Alc. propylique		5.0	58.7	57.1	60.2	33.1	15.7
Alc. butylique		2.8	52.6	63.1	62.0	58.2	
Alc. isoamylique		4.8	5.3	63.3	61.2	60.4	65.7

TABLEAU III

Volume ajouté	0 cc.	1 cc.	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.
Alc. méthylique	1.2	1.3	5.8	28.0	30.5	35.9	22.9
Alc. éthylique		4.3	27.6	37.3	32.5	38.9	37.1
Alc. propylique				35.0	44.8		
Alc. butylique				39.5	41.5		
Alc. isoamylique			29.0	33.6	37.5	37.8	37.1

TABLEAU IV

Volume ajouté	0 cc.	1 cc.	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.
Alc. méthylique				8.5	34.9	21.0	26.6
Alc. éthylique				35.4	33.4	26.3	
Alc. propylique				37.3	37.5	32.9	
Alc. butylique				36.8			
Alc. isoamylique				16.0	38.7	35.8	

TABLEAU V

Volume ajouté	1 cc.	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.	7 cc.
Alc. méthylique	1.5	4.9	28.0	30.2	30.5	25.8	
Alc. éthylique	4.3	29.4	37.3	37.0	36.8	36.9	
Acétone		1.4	3.3	10.6	30.0	37.3	36.4

TABLEAU VI

Volume ajouté	1 cc. 5	2 cc.	2 cc. 5	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.
Alc. méthylique	2.6	31.6	37.7	36.8	37.7		
Alc. éthylique		5.6	14.8	36.0	36.0	32.8	
Acétone			3.4	11.0	38.2	36.0	36.2

TABLEAU VII

Vol. ajouté	1 cc.	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.	7 cc.	8 cc.	9 cc.	10 cc.
Acétone ..	2.4	12.6	20.6	23.0	29.6	30.0	30.2	31.1	24.8	16.0

II

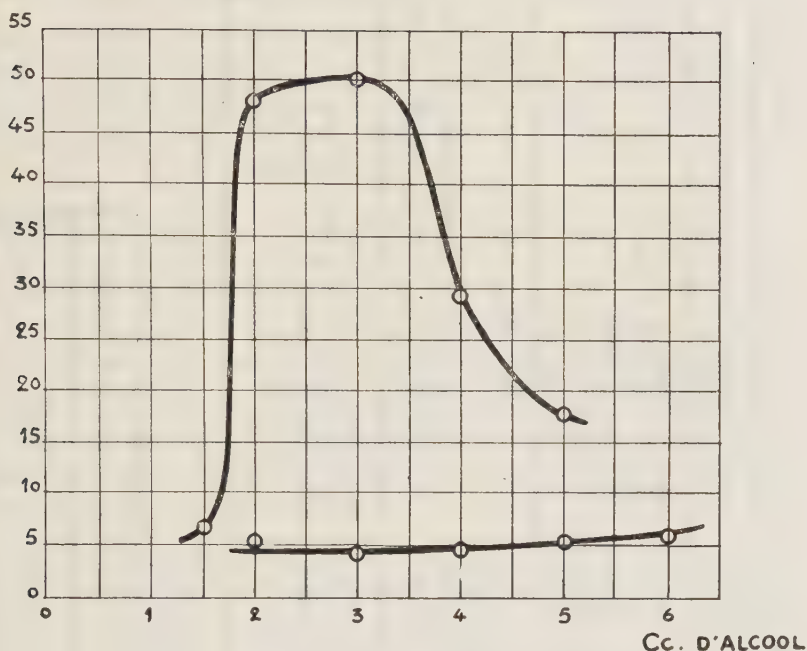
SUBSTANCES NE FAVORISANT PAS L'EXTRACTION DES LIPIDES PAR L'ETHER

Ces substances forment un second groupe constitué par :

- Le glycol éthylénique ;
- L'aldéhyde formique ;
- L'aldéhyde éthylique ;
- L'acide sulfurique normal ;
- La soude normale.

L'expérience montre que pour ces composés, la quantité de graisses extraite est sensiblement la même qu'en présence d'éther seul, même pour des concentrations très supérieures à celles qui sont utilisées pour les composés du premier groupe.

MGR. DE LIPIDES EXTRAITS



COURBE SUPÉRIEURE : CYCLOHEXANOL
COURBE INFÉRIEURE : GLYCOL

Pour ces substances, il ne se forme jamais d'émulsion entre les phases aqueuse et éthérée.

Glycol. — Lorsqu'à 25 cc de sérum + 25 cc d'éther, on ajoute des quantités de glycol inférieures à 10 cc, le sérum n'est pas dénaturé. L'extrait éthéré n'est pas augmenté.

Aldéhyde formique. — Même employé à des concentrations assez fortes, il ne produit pas de précipité dans le sérum. L'extrait éthéré n'est pas augmenté.

TABLEAU VIII

Volume ajouté	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc
Alc.	4.3	30.5	37.3	37.0	38.9	35.7
Acétone	4.4	5.5	19.9	22.6	37.3	36.4
Ald. éthylique	2.0	5.0	3.7	6.2	5.6	6.2

TABLEAU IX

Volume ajouté	1 cc5	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc	8 cc	9 cc	10 cc
Alc. méthylrique		6.3	8.8	10.5	18.8	49.0	28.5			
Acétone		4.1	5.1	12.8	17.4	47.0	49.9			
Alc. éthylique		5.0	29.7	42.8	48.8	20.7		50.3	24.3	9.1
Cyclohexanol .	6.6	48.0	50.0	29.1	17.7					
Glycol		5.1	4.3	4.7	5.1	5.8				

TABLEAU X

Volume ajouté	0 cc	1 cc5	2 cc	2 cc5	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc	8 cc	9 cc
Alcool méthylrique											
Acétone				105.6	98.0	109.5					
Alcool éthylique	4.0	11.1	98.3	101.2	102.4	104.9	12.3	93.2	93.6	87.8	
Cyclohexanol			87.2			102.6	112.3	104.2			
Glycol								4.1		5.1	6.3

TABLEAU XI

Volume ajouté	3 cc	4 cc	5 cc	7 cc
Alcool éthylique	38.8	38.1	38.2	
Aldéhyde formique	2.2	1.2	1.2	2.0

Aldéhyde éthylique. — A partir du taux de 4 cc pour 25 cc de sérum + 25 cc d'éther, l'aldéhyde éthylique coagule le sérum qui prend l'aspect d'un magma gélatineux brun foncé. Le sérum est profondément dénaturé, mais la quantité de lipides dissoute dans l'éther surnageant n'est aucunement augmentée.

ACIDE SULFURIQUE ET SOUDE EN SOLUTION NORMALE :

L'étude de l'action sur le sérum de l'acide sulfurique et de la soude avait pour but d'élucider le problème suivant :

Peut-on, par une modification convenable du pH, provoquer à froid l'extraction des lipides du sérum par l'éther ?

Les auteurs qui s'étaient occupés de l'action des acides et surtout des alcalis sur le sérum avaient en vue le dosage d'une substance particulière.

KUMAGAWA et SUTO (1908) cherchèrent si, par saponification aqueuse suivie d'extraction étherée, on pouvait obtenir la séparation des graisses du sérum. Ces auteurs montrèrent que les lipides ne sont libérés de leurs combinaisons avec les protéides qu'après une longue saponification par la soude à une concentration assez élevée et à chaud.

GRIGAUT (1912) reprit un point particulier de cette étude à propos du dosage du cholestérol. L'extraction totale de cette substance nécessite une digestion prolongée pendant une heure en présence de 10 à 20 % de soude et à la température de 110°.

MACHEBŒUF (1928) au cours de ses recherches sur les cénapses lipides-protéides, observa que, dans les précipitations à pH = 3.8, les lipides accompagnent presque intégralement les albumines.

Dans un premier travail (1933), nous avons montré avec SANDOR [4] que les liaisons lipides-protéides présentent une grande résistance à l'effet peptique. Du sérum de cheval fut soumis à l'action de différents échantillons de pepsine à des concentrations variables en ions hydrogène. La digestion peptique fut prolongée trois jours : l'extraction étherée ne fut pas du tout augmentée. Ceci nous montre en par-

Remarques :

Dans la zone alcaline, la phase sérique a pris une couleur verte ; celle-ci est due à la biliverdine formée par oxydation de la bilirubine, pigment jaune du sérum. Sous l'influence de petites quantités de soude, non seulement l'extraction n'a pas augmenté, mais elle a plutôt rétrogradé.

Dans la zone acide, l'éther est coloré en jaune. La bilirubine est en effet un acide monobasique faible qui est déplacé par l'acide sulfurique. Le pigment, non accompagné de graisses, est peu soluble dans l'éther, ce qui explique que le solvant est faiblement coloré. Ici encore l'acidité n'a pas augmenté l'extraction. Pour des concentrations en acide sulfurique supérieures à 3 cc, un trouble léger apparaît dans le sérum.

L'extractibilité des lipides par l'éther reste donc très faible dans presque toute l'échelle de pH. Les liaisons lipides-protéides ne sont détruites ni par une acidité ni par une alcalinité un peu élevées. Bien plus, aux environs de la neutralité, entre les pH 6 et 8, l'extraction est légèrement plus élevée.

Conclusions :

Ces résultats sont intéressants, car ils montrent *qu'on ne provoque pas la destruction des cénapses lipoprotéidiques par une simple modification de la charge électrique des protéides*. Dans toute l'échelle de pH étudiée (de 1.7 à 13.3) le système lipoprotéidique du sérum est resté d'une remarquable stabilité à l'action de l'éther. Les chaînes lipidiques ne sont nullement libérées de leurs attaches avec les protéides et leurs produits de dédoublement; il est nécessaire d'employer des moyens très énergiques (KUMAGAWA et SUTO, GRIGAUT) pour obtenir ce résultat.

CONCLUSIONS :

Cette première série de recherches nous permet donc de formuler les conclusions suivantes :

Certaines substances présentent le phénomène décrit par MACHEBŒUF et SANDOR pour l'alcool éthylique : introduites dans le système (sérum + éther), elles provoquent la dissociation des cénapses lipoprotéidiques dès que leur concentration dans ce milieu atteint une certaine valeur.

Ce sont les alcools méthylique, éthylique, propylique, butylique et isoamylique ainsi que le cyclohexanol et l'acétone.

Résultat tout à fait remarquable : le taux à partir duquel elles provoquent la rupture des liaisons lipides-protéides varie de l'une à l'autre dans des proportions très notables, mais la *quantité de lipides extraite lorsque l'équilibre est atteint est la même pour toutes ces substances.*

D'autres composés, au contraire, n'ont aucune action sur l'extractibilité des lipides sériques.

Ce sont : le glycol, les aldéhydes formique et éthylique, l'acide sulfurique et la soude en solution normale.

La quantité de lipides extraite en présence de ces substances est sensiblement la même qu'avec l'éther seul, c'est-à-dire très minime.

En présence d'éther, le système lipoprotéidique du sérum présente une remarquable stabilité à des variations très importantes du pH (de 1.7 à 13.3) et à l'action des diastases protéolytiques.

Il existe donc un certain nombre de substances qui, agissant à la température ordinaire en présence d'éther, sont capables d'arracher aux protéides du sérum une partie des lipides qui leur sont liés. La quantité de lipides ainsi libérée lorsque les conditions optima sont réalisées est indépendante de la substance ajoutée au système (sérum + éther). *Elle caractérise donc uniquement le sérum examiné; rapportée aux lipides totaux, elle mesure la stabilité des lipides dans le système lipoprotéidique et constitue ainsi une caractéristique physico-chimique du sérum dont l'importance va être encore soulignée.*

AUTRES RECHERCHES SUR L'EXTRACTIBILITE DES LIPIDES SERIQUES

CHARONNAT (1935 et 1936) étendit les recherches de MACHEBŒUF et SANDOR et les nôtres sur la mise en liberté des lipides par l'action combinée d'éther et de substances à fonction alcool ou cétone. S'attachant plus particulièrement à l'extractibilité du cholestérol, il montra que cette propriété appartient aussi à divers sels et à des substances non électrolytes [6].

Appliquant nos conclusions, sans nous citer d'ailleurs, à l'étude de la stabilité du cholestérol, il propose de prendre en considération le *coefficient d'extractibilité*, c'est-à-dire le rapport entre le poids de cholestérol extrait par l'éther seul dans des conditions de dilution, d'agitation et de contact déterminées et le cholestérol total extrait par la méthode de GRIGAUT. Ce coefficient permet d'évaluer la solidité de la liaison du cholestérol avec son support colloïdal dans le sérum et dans la bile.

L'auteur montre que différents sels d'acides gras peuvent remplacer l'alcool ou même l'alcool sodé dans la technique originale de GRIGAUT. L'extractibilité ne devient notable qu'à partir du terme en C_4 . Avec le composé en C_9 (pélargonate) et ses homologues supérieurs, en présence de soude, elle devient pratiquement totale.

L'alcalinisation permet de réaliser l'extraction avec des teneurs plus faibles en anion.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.): Recherches sur la nature et la stabilité des liaisons protéides-lipides du sérum sanguin. Etude de l'extraction des lipides par l'éther en présence d'alcool.
Bull. Soc. Chim. biol., 1932, **14**, 1168.
 - 2 — DELAGE (B.): Contribution à l'étude de la stabilité des liaisons lipoprotéidiques dans le sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol., 1935, **17**, 927.
 - 3 — DELAGE (B.): Extractibilité des lipides sériques par l'éther en fonction du pH.
Bull. Soc. Chim. biol., 1936, **18**, 1600.
 - 4 — SANDOR (G.) et DELAGE (B.), in : SANDOR (G.), Le problème des protéides 1 vol., *Doin* (1933), p. 76.
 - 5 — VLES (F.): Notes sur l'électrode d'antimoine.
Arch. de Phys. biol., 1927, **6**, 92.
 - 6 — CHARONNAT (M.).
Note : in : *J. de Pharm. et de Chimie*, 1935, **21**, 574.
et : Substances variées pouvant libérer le cholestérol de son support protéidique.
Bull. Sc. pharm., 1936, 38.
-

CHAPITRE II

ANALYSE

DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EXTRACTIBILITÉ DES LIPIDES SÉRIQUES

Les conclusions formulées au chapitre précédent peuvent s'énoncer ainsi :

Certaines substances (par exemple : l'éthanol) provoquent à froid la dissociation des cénapses lipoprotéidiques et la quantité maxima de lipides extraite est la même pour toutes. D'autres (par exemple : le glycol) n'ont pas plus d'action sur l'extractibilité des lipides sériques que l'éther seul [1].

Le phénomène se présente donc sous un aspect caractéristique : il est régi par une loi de « Tout ou rien ». L'extraction s'effectue complètement ou pas du tout, mais, une fois amorcée, elle évolue jusqu'à son terme.

Nous nous sommes proposés de rechercher de quels facteurs dépend l'ensemble des faits observés [2] et quelle action chimique ou physique produit dans le système (sérum + éther) l'addition d'une des substances favorisant l'extraction.

Le facteur concentration en ions hydrogène doit tout d'abord être éliminé. Les solvants organiques neutres étudiés n'agissent pas sur l'ionisation des protéides. Quant à l'acide sulfurique et à la soude, lorsque le pH reste compris entre 1.7 et 13.3, ils n'augmentent pas la quantité de lipides que l'éther peut arracher au sérum [3].

Après examen des facteurs solubilité et capillarité, nous avons été amenés à émettre trois hypothèses. Nous verrons que deux d'entre elles (la deuxième et la troisième) sont liées. Ces hypothèses ont été soumises au contrôle expérimental.

Exposé de la 1ère hypothèse.

Supposons que l'extraction des lipides ne puisse se produire qu'à partir d'une concentration minima d'éther dans la phase aqueuse. Si l'on ajoute au mélange (sérum + éther) une substance augmentant la solubilité de l'éther dans le sérum, l'extraction doit être favorisée.

Si cette hypothèse s'avère exacte, solubilité de l'éther dans la phase aqueuse et extractibilité des lipides varieraient dans le même sens. Les substances n'agissant pas sur le premier facteur ne devraient avoir aucun effet sur le second.

Exposé de la 2ème hypothèse.

L'éther, agissant seul, est incapable d'arracher ses lipides au sérum. Tout se passe comme si la micelle lipoprotéidique était entouré d'une zone périphérique imperméable à l'éther.

Le nouveau solvant que constitue la solution dans l'éther de certaines substances (celles précisément qui favorisent l'extraction) serait capable, lui, de franchir cette barrière, de venir au contact des chaînes lipidiques et de les dissoudre.

Solubilité dans l'éther et action positive sur le processus d'extraction seraient donc deux propriétés des substances étudiées liées entre elles par une relation causale directe.

Le phénomène présenterait une certaine analogie avec le mordantage, la substance ajoutée jouant entre le sérum et l'éther le rôle que joue le mordant entre l'étoffe à teindre et le colorant dans les procédés de teinture indirecte.

Exposé de la 3ème hypothèse.

L'éther ne peut arracher ses lipides aux cénapses lipoprotéidiques parce que l'énergie libre à leur surface est trop grande.

Une condition nécessaire de l'extraction des lipides serait la diminution de l'énergie interfaciale dans le système (sérum, éther). Or, la mesure de cette énergie libre est la tension interfaciale sérum-éther ; les substances ayant la propriété de diminuer cette tension interfaciale pourraient provoquer l'extraction des lipides.

EXAMEN DE LA 1ère HYPOTHESE
SOLUBILITE DE L'ETHER DANS LE SERUM
EN PRESENCE DES DIFFERENTES
SUBSTANCES ETUDIEES

Les premiers essais entrepris en vue de soumettre chacune de ces hypothèses au contrôle expérimental direct nous ont montré que le problème n'était pas aussi simple qu'il le paraissait au premier abord. Il se forme très souvent à l'interface sérum-éther une émulsion plus ou moins abondante et stable qui rend les lectures malaisées et même dans certains cas impossibles.

Nous avons alors pensé à chercher une solution approximative du problème dans la substitution au sérum d'eau physiologique, milieu qui, ne présentant pas l'inconvénient que nous avons signalé, se prête à des mesures précises.

Pour justifier ce mode opératoire, il faut se demander si l'on peut tirer de l'étude du système (eau-éther-substance) des renseignements susceptibles d'éclairer le mécanisme de l'extraction lipidique dans le système (sérum-éther-substance).

Cela paraît à peu près certain.

Les micelles lipoprotéidiques sont en effet dispersées dans une solution aqueuse. Les groupements carbure d'hydrogène des chaînes lipidiques et polypeptidiques sont orientés à l'intérieur et les groupements polaires (carboxyle, amine,

amide, etc...) vers l'extérieur de la micelle et plus ou moins énergiquement liés aux molécules d'eau du milieu dispersant (MACHEBŒUF et SANDOR).

L'hypothèse de LANGMUIR (1917) de l'orientation moléculaire [4] se trouve directement vérifiée par une élégante expérience de DEVAUX [5] :

Si l'on fige par refroidissement dans leur état de polarisation certaines substances (naphtaline, paraffine, cire vierge) que l'on a fait fondre dans l'eau chaude et qui se sont rassemblées à la surface de ce liquide, les deux faces de la lentille ainsi formée ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis de l'eau, qui roule sur la face supérieure constituée par les groupements éleïques et colle au contraire à la face inférieure formée par les groupements hydrophiles de ces molécules organiques.

Des travaux dont nous aurons à nous occuper et qui sont dûs à des auteurs strasbourgeois (NICLOUX, FONTES, AMBARD) apportent une preuve directe de l'existence de cette zone périphérique d'hydratation.

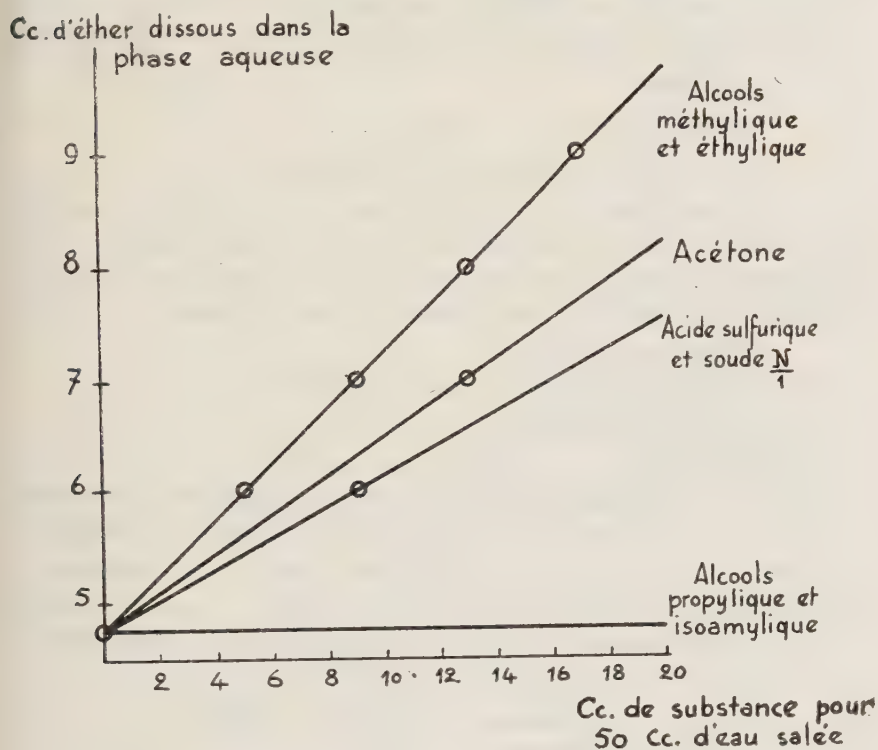
L'éther, mis en présence du sérum, rencontre donc cette zone aqueuse et doit la franchir avant d'atteindre les groupements éleïques. Aussi nous a-t-il paru légitime, en première approximation, de remplacer le sérum par de l'eau et de nous orienter à l'aide de ces premiers résultats.

ESSAIS FAITS AVEC L'EAU

Dans un cloche en verre de forme cylindrique allongée (1 à 2 cm² de section), on introduit 50 cc d'eau salée à 1 p. 100. A l'aide d'une pipette graduée, l'on ajoute l'éther par fractions de 0.5 ou 1 cc et l'on mélange soigneusement par retournements successifs de la cloche graduée après chaque addition de liquide.

Le système, d'abord monophasique (solution non saturée), devient diphasique (solution saturée). On obtient ainsi deux valeurs l'une par excès, l'autre par défaut de la solubilité de l'éther dans l'eau salée (on peut avoir une meilleure approximation en ajoutant l'éther par fractions plus petites ; cela n'est nullement nécessaire).

A 16-17,° 50 cc d'une solution à 1 p. 100 de chlorure de sodium dissolvent une quantité d'éther rectifié à 65° Bé comprise entre 4,5 et 5 cc.



On ajoute alors 2 cc d'alcool. La solubilité de l'éther dans la phase aqueuse augmentant, le système devient monophasique. On ajoute à nouveau de l'éther par fractions de 0 cc 5 jusqu'à ce que le système devienne diphasique. Après avoir noté la quantité d'éther introduite, on ajoute à nouveau 2 cc d'alcool, etc...

En procédant ainsi, on détermine la solubilité de l'éther dans l'eau alcoolisée en fonction de la concentration alcoolique. On procède de même pour chacune des substances étudiées.

Les courbes représentant les volumes d'éther dissous en fonction des volumes d'alcool ajoutés sont sensiblement des droites. (Pour obtenir les courbes de solubilité, il faudrait

pour chaque valeur ramener par le calcul à l'unité de volume de solution).

Les coefficients angulaires de ces droites se classent par ordre décroissant de la façon suivante :

Alcools méthylique et éthylique,

Acétone,

Acide sulfurique et soude $\frac{N}{1}$,

Alcools propylique et isoamylique.

Or, cet ordre n'est pas du tout celui de leur efficacité sur le phénomène d'extraction des lipides sériques. Ces substances, nous l'avons vu, peuvent être classée ainsi d'après la valeur croissante de leur concentration critique :

Alcool propylique,

Alcools éthylique et isoamylique,

Alcool méthylique,

Acétone.

L'acide sulfurique et la soude en solution normale viennent naturellement se ranger à la suite de ces composés.

Cette classification et la précédente sont donc totalement différentes.

Ainsi les alcools éthylique et isoamylique se comportent tout à fait de la même façon au point de vue de l'extrac-

tibilité. Cependant le premier est soluble dans l'eau et augmente la solubilité de l'éther dans la phase aqueuse ; le second n'a aucune de ces deux propriétés.

Alcools méthylique et éthylique (absolus)		
Ether	Alcool	Nombre de phases
5 cc		2
	2 cc	2
	4 cc	1
6 cc		2
	6 cc	2
	8 cc	1
7 cc		2
	10 cc	2
	12 cc	1
8 cc		2
	14 cc	2
	16 cc	1
9 cc		2
	18 cc	2
	20 cc	1

Alcools propylique et isoamylique		
Ether	Alcool	Nombre de phases
5 cc		2
	2 cc	
		
	20 cc	2

Acétone		
Ether	Acétone	Nombre de phases
5 cc		2
	2 cc	2
	4 cc	1
6 cc		2
	6 cc	-
	8 cc	-
	10 cc	-
	12 cc	1
7 cc		2
	14 cc	2
	16 cc	2
	18 cc	1
7 cm ³ ,5 ..		2
	20 cc	1

Acide sulfurique N/1 Soude N/1		
Ether	Subst.	Nombre de phases
5 cc		2
	2 cc	-
	4 cc	-
	6 cc	-
	8 cc	1
6 cc		2
	10 cc	
		
		
	20 cc	2

On peut noter également qu'un abaissement de température accroît la solubilité de l'éther dans l'eau mais n'augmente pas l'intensité de l'extraction, comme nous le verrons au prochain chapitre.

Il n'y a donc aucune relation entre l'action des différentes substances sur l'extractibilité des lipides sériques et la solubilité de l'éther dans l'eau.

ESSAIS FAITS AVEC LE SERUM

Dans une nouvelle série d'essais le sérum a été substitué à l'eau salée. Les lectures, nous l'avons dit, sont souvent difficiles par suite de la formation aux interfaces d'émulsions très stables.

Certains sérums conviennent mieux que d'autres aux mesures et l'on est obligé de faire un choix empirique.

Les conclusions qu'on peut tirer de cette étude sont les suivantes : le sérum se comporte sensiblement comme l'eau en tant que solvant de l'éther. Les différences observées sont d'ordre quantitatif, l'éther étant un peu plus soluble dans le sérum que dans l'eau. Mais le sens général du phénomène et l'ordre dans lequel se classent ces substances sont les mêmes que pour l'eau.

Alcool éthylique absolu		
Ether	Alcool	Nombre de phases
5 cc		1
6 cc		2
	2 cc	1
8 cc		2
	4 cc	1
9 cc		2
	6 cc	2
	8 cc	1
10 cc		2

Glycol		
Ether	Glycol	Nombre de phases
5 cc		1
6 cc		2
	2 cc	2
	4 cc	1
7 cc		2
	6 cc	2
	8 cc	2
	10 cc	2

EXAMEN DE LA 2ème HYPOTHESE MODIFICATION DE LA NATURE DU SOLVANT PAR SUITE DE LA DISSOLUTION DANS L'ETHER DE CERTAINES SUBSTANCES

L'examen de la deuxième hypothèse comportait l'étude des relations qui peuvent exister entre la solubilité de chacune des substances dans les phases aqueuse et étherée du système (sérum-ether-substance) et leur action sur l'extractibilité des lipides sériques.

Les essais préliminaires ont été effectués en remplaçant le sérum par de l'eau.

ESSAIS FAITS AVEC L'EAU

La solubilité dans l'eau et dans l'éther de chacune des substances étudiées et leur répartition entre ces deux solvants sont appréciées de la façon suivante :

On prend deux tubes gradués de 25 cc : dans chacun d'eux l'on introduit 5 cc de la substance et l'on complète à 20 cc, le premier avec de l'eau salée, le second avec de l'éther. Après avoir agité soigneusement on note les volumes respectifs des phases ; on se contente de cette estimation approximative de la solubilité de la substance.

On mélange alors le contenu des deux tubes et on note les volumes des phases aqueuse et éthérée, ce qui indique comment se partage chacune des substances entre les deux solvants.

La lecture des tableaux nous permet de dégager les conclusions suivantes :

1. Solubilité dans l'eau.

Il n'y a aucune relation entre la solubilité de la substance dans l'eau et son activité sur l'extraction lipidique, comme nous l'avions constaté en examinant la première hypothèse.

Ainsi, parmi les substances qui favorisent l'extraction lipidique, les alcools méthylique, éthylique, propylique et l'acétone sont solubles dans l'eau ; les alcools butylique, isoamylique et le cyclohexanol sont insolubles ou peu solubles.

Mais nous avons étudié cinq substances (glycol, aldéhydes formique et éthylique, acide sulfurique et soude) qui n'agissent pas sur l'extractibilité bien que solubles dans l'eau.

2. Solubilité dans l'éther.

Il y a, par contre, une relation directe entre la solubilité dans l'éther et l'extractibilité.

Les substances qui n'agissent pas sur l'extractibilité lipidique sont insolubles ou très peu solubles dans l'éther.

Ce sont : le glycol, les aldéhydes formique et éthylique, l'acide sulfurique et la soude.

Les substances qui provoquent l'extraction des lipides lorsqu'elles sont ajoutées au mélange sérum + éther sont solubles dans l'éther.

Ce sont : les alcools méthylique, éthylique, propylique, butylique, isoamylique, le cyclohexanol et l'acétone.

Solubilités réciproques dans les mélanges
(eau-éther-substance)

<i>Alcool méthylique</i>	Alcool	5 cc	}	soluble	}	Ether 11
	Eau —————>	20 cc				
	Alcool	5 cc	}	soluble	}	Eau 29
	Ether —————>	20 cc				
<i>Alcool éthylique</i>	Alcool	5 cc	}	soluble	}	Ether 16,5
	Eau —————>	20 cc				
	Alcool	5 cc	}	soluble	}	Eau 23,5
	Ether —————>	20 cc				
<i>Alcool propylique</i>	Alcool	5 cc	}	soluble	}	Ether 25
	Eau —————>	20 cc				
	Alcool	5 cc	}	soluble	}	Eau 15
	Ether —————>	20 cc				
<i>Alcool isoamylique ...</i>	Alcool	5 cc	}	insoluble	}	Ether 25
	Eau —————>	20 cc				
	Alcool	5 cc	}	soluble	}	Eau 15
	Ether —————>	20 cc				
<i>Cyclohexanol</i>	Cyclohexanol .	5 cc	}	presque insoluble	}	Ether 25
	Eau —————>	20 cc				
	Cyclohexanol .	5 cc	}	soluble	}	Eau 15
	Ether —————>	20 cc				
<i>Acétone</i>	Acétone	5 cc	}	soluble	}	Ether 17
	Eau —————>	20 cc				
	Acétone	5 cc	}	soluble	}	Eau 23
	Ether —————>	20 cc				
<i>Glycol</i>	Glycol	5 cc	}	soluble	}	Ether 15
	Eau —————>	20 cc				
	Glycol	5 cc	}	insoluble	}	Eau 25
	Ether —————>	20 cc				

Acide sulfurique $\frac{N}{I}$	Acide	5 cc	}	soluble	}	Ether 13
	Eau $\longrightarrow$	20 cc				
	Acide	5 cc	}	presque insoluble	}	Eau 27
	Ether $\longrightarrow$	20 cc				
Soude $\frac{N}{I}$	Soude	5 cc	}	soluble	}	Ether 13
	Eau $\longrightarrow$	20 cc				
	Soude	5 cc	}	presque insoluble	}	Eau 27
	Ether $\longrightarrow$	20 cc				

ESSAIS FAITS AVEC LE SERUM

Les expériences ont été répétées avec le sérum de cheval. Les résultats sont les mêmes qu'avec l'eau salée.

On peut donc formuler les conclusions suivantes :

Il n'y a aucune relation entre l'extractibilité des lipides sériques et la solubilité dans la phase aqueuse du système (sérum-éther-substance) des substances qui provoquent le phénomène d'extraction.

Les substances qui agissent sur l'extractibilité sont solubles dans l'éther ; celles qui n'agissent pas sont insolubles dans l'éther.

EXAMEN DE LA 3ème HYPOTHESE DIMINUTION DES FORCES CAPILLAIRES AU NIVEAU DE LA MICELLE LIPOPROTEIDIQUE

ESSAIS FAITS AVEC L'EAU

Prenant toujours pour objet de nos premiers essais le système (eau-éther-substance) nous avons cherché comment varie la tension interfaciale eau-éther en fonction de la concentration en chacune des substances utilisées.

Le mode opératoire est le suivant :

Dans une série d'ampoules à décanter nous mettons 50 cc d'eau salée, 50 cc d'éther et des quantités de la substance étudiée variant de 0 à 20 cc. Après agitation et saturation réciproque des phases le contenu d'une ampoule est recueilli

dans un récipient cylindrique de diamètre et de capacité convenables.

La tension superficielle de la phase étherée est mesurée avec l'appareil de LECOMTE DU NOÛY. À défaut de tensiomètre interfacial, le même appareil nous sert aussi à mesurer la constante capillaire à l'interface eau-éther. Les chiffres obtenus sont entachés de ce fait d'une erreur systématique mais celle-ci est tout à fait négligeable.

Les chiffres donnés par LECOMTE DU NOÛY [6], sont en effet les suivants :

Température en ° C	15°	17°	19°	21°
Tension interfaciale eau/éther éthylique	10,3	10,4	10,6	10,9

Nos mesures faites vers 20° nous donnent des chiffres compris entre 10.7 et 11.0 dynes/cm.

Nous ne rapporterons pas les résultats qui ont trait à la tension superficielle : elle croît assez régulièrement avec la concentration, et cela pour toutes les substances étudiées.

La tension interfaciale, au contraire, est très intéressante à étudier. D'une manière générale elle diminue lorsqu'on ajoute au mélange (sérum + éther) l'une quelconque des substances étudiées, mais cette diminution est loin d'être égale pour toutes.

Tension interfaciale dans les systèmes (eau-éther-substance)

Cc de substance	0	2	4	6	8	10	12	20
Alcool éthylique	11,0	9,6	8,3	7,0	5,8	5,0	3,9	1,1
Alcool méthylique	10,8	9,8	9,5	8,3	7,5	7,0	6,3	3,3
Cyclohexanol	10,8	9,1	9,3	6,9	6,3	5,6	5,0	4,1
Acétone	10,9	10,1	7,9	8,6	7,9	7,4	6,8	4,4
Alcool isoamylique	10,8	8,6	8,3	7,4	6,8	6,3	6,0	4,5
Glycol	10,9	10,4	10,5	10,1	10,0	10,4	9,9	9,5
Acide sulfurique N/1	11,0	10,8	10,6	10,6	10,5			10,3
Soude N/1	10,7	9,4	8,7	8,1	8,0			6,2

Comparons les chiffres obtenus pour l'alcool éthylique et pour le glycol. Pour le premier il y a chute rapide de la tension interfaciale avec la concentration alcoolique (de 11,0 à 1,1 dynes quand on passe de 0 à 20 cc d'alcool. Chute de tension : $9.9 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$). Pour le second cette chute est seulement de $1.4 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$.

Ainsi il y a à ce point de vue une différence considérable entre l'alcool éthylique qui favorise l'extraction des lipides et le glycol qui n'a aucune action sur ce phénomène.

L'alcool méthylique présente une chute de tension ($7.5 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$) un peu inférieure à celle de son homologue supérieur. Puis viennent le cyclohexanol ($6.7 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$), l'acétone ($6.5 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$) et l'alcool isoamylique ($6.3 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$).

Les substances qui n'ont aucune action sur l'extractibilité des lipides sériques sont le glycol (chute de tension : $1.4 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$), l'acide sulfurique $\frac{N}{1}$ ($0.7 \frac{\text{dyne}}{\text{cm.}}$) et la soude $\frac{N}{1}$ ($4.5 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$).

La soude présente une chute de tension inférieure à celle de toutes les substances qui provoquent l'extraction, mais tout de même notablement plus élevée que celle de l'acide sulfurique et du glycol.

Ceci nous montre bien qu'il ne faut pas prendre ces chiffres en valeur absolue. Il n'y a pas proportionnalité entre la chute de tension interfaciale et l'extractibilité des lipides, mais plutôt déclenchement de ce phénomène dès que les forces capillaires à l'interface sérum-éther sont tombées au-dessous d'une certaine limite.

ESSAIS FAITS AVEC LE SERUM

Pour suivre le plan que nous avons établi, l'eau salée a été remplacée par le sérum.

Les résultats obtenus avec les sérums de cheval, d'âne ou de génisse sont tout à fait irréguliers et décevants.

La tension interfaciale sérum-éther semble être de l'ordre de $4 \text{ à } 4,5 \frac{\text{dynes}}{\text{cm.}}$. Quand on ajoute de l'alcool, cette tension diminue mais de façon tout à fait irrégulière ; de plus les différentes séries de mesures ne sont pas du tout comparables.

Le sérum au $1/100^{\text{me}}$ présente encore les mêmes inconvénients. Mais pour une dilution de $1/10.000^{\text{me}}$ les mesures deviennent possibles. LECOMTE DU NOÛY a montré [6] que diverses propriétés de surface du sérum passaient par une valeur critique pour une telle concentration quand les mesures étaient faites dans des récipients de forme appropriée. (Maximum de la chute de tension superficielle, couche monomoléculaire des protéides sériques).

Voici deux séries de chiffres correspondant aux mélanges de 50 cc de sérum au $1/10.000^{\text{me}}$ + 50 cc d'éther en présence des quantités indiquées d'alcool éthylique ou de glycol.

Volume ajouté	0 cc	2 cc	4 cc	6 cc	8 cc	10 cc	12 cc	20 cc
Alcool éthylique ..	8.9	8.0	7.6	7.2	6.5	5.4	4.7	2.0
Glycol	8.9	8.4	8.1	7.8	7.7	8.2	7.1	7.4

Valeur de la tension interfaciale (en dynes/cm) entre les phases aqueuse et éthérée dans les systèmes constitués par 50 cc de sérum au 10.000^{e} , 50 cc d'éther et les quantités d'alcool éthylique et de glycol indiquées.

On voit que les conclusions que nous avons pu tirer de l'étude du système (eau-éther-substance) s'appliquent qualitativement au système (sérum au $1/10.000^{\text{me}}$ - éther - substance).

CONCLUSIONS

Cherchant à élucider le mécanisme physico-chimique de l'extraction de lipides sériques à froid par l'éther en présence de différentes substances, nous avons pu dégager les résultats suivants :

1. *La solubilité de l'éther dans la phase aqueuse du sérum n'intervient pas.* Parmi les substances qui favorisent l'extraction certaines sont solubles dans l'eau ; d'autres sont insolubles, et ne peuvent par conséquent augmenter la solubilité de l'éther dans la phase aqueuse du sérum.

2. *Les substances qui favorisent l'extraction lipidique sont solubles dans l'éther. Elles abaissent notablement la tension interfaciale sérum/éther.*

3. *Les substances qui n'ont pas d'action sur l'extraction sont insolubles ou peu solubles dans l'éther et n'ont qu'une action dépressive assez faible sur la tension interfaciale.*

Les deux propriétés sont liées, l'abaissement de la tension interfaciale étant dû précisément à la dissolution dans l'éther de la substance ajoutée.

HYPOTHESE BASEE SUR LA LIBERATION DES LIPIDES DU SERUM PAR UN SAVON

MACHEBŒUF et TAYEAU [7] reprennent (1938) les expériences de CHARONNAT pour vérifier l'hypothèse d'après laquelle certains lipides seraient maintenus dans l'eau par solvation réciproque des chaînes polyméthyléniques des lipides et des protéides (MACHEBŒUF et SANDOR 1932).

Par agitation de sérum avec de l'éther additionné d'oléate de soude, ils obtiennent un extrait lipoïdique beaucoup plus abondant qu'avec l'éther seul. Ils admettent que le sel d'acide gras s'est solvaté sur les protéides à la place des lipides qu'il a libérés et que l'éther a dissous.

Il est possible que des substances ayant une chaîne polyméthylénique d'une longueur comparable à celle des lipides se comportent d'une façon assez particulière et différente de composés à chaîne éléique très courte telle que ceux que nous avons étudiés (alcools, cétones, etc...). Pour ceux-ci la solubilité dans l'éther est une condition nécessaire de leur action sur l'extraction.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — DELAGE (B.): Contribution à l'étude de la stabilité des liaisons lipoprotéidiques dans le sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol., 1935, **17**, 927.
 - 2 — DELAGE (B.): Contribution à l'étude des liaisons lipides-protéides dans le sérum sanguin.
Analyse des facteurs physico-chimiques de l'extractibilité des lipides sériques par l'éther en présence de différentes substances.
Bull. Soc. Chim. biol., 1936, **18**, 1603.
 - 3 — DELAGE (B.) : Extractibilité des lipides sériques par l'éther en fonction du pH.
Bull. Soc. Chim. biol., 1936, **18**, 1600.
 - 4 — LANGMUIR : *J. of the american chemical Society*, 1917, **39**, 1848.
 - 5 — DEVAUX (H.): Sur la mouillabilité des surfaces solides et sur l'orientation des molécules superficielles.
Bull. Soc. fr. de Physique, 1923, n° 182.
 - 6 — LECOMTE DU NOÛY (P.): Equilibres superficiels des solutions colloïdales.
Paris, *Masson*, 1 vol. (1929).
 - 7 — MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU : Sur l'état des lipides et du cholestérol dans le sérum sanguin; destruction de certaines cénapses lipoprotéidiques et libération de leurs substances lipoïdiques par un savon.
C. R. Ac. Sc., 1938, **206**, 860.
-

CHAPITRE III

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE ET DU pH SUR L'EXTRACTIBILITÉ DES LIPIDES SÉRIQUES

L'énergie des liaisons qui unissent lipides et protéides est essentiellement fonction de certains facteurs physiques. Nos recherches ont trait à l'action sur le système (sérum-alcool-éther) de la température extérieure et du pH.

I

TEMPERATURE

Nous avons étudié l'extractibilité des lipides sériques par l'éther en présence de différentes substances et montré que, pour toutes celles qui favorisent l'extraction, la quantité maxima de lipides libérés de leurs attaches protéidiques est la même. De plus, cette quantité reste inchangée si, faisant varier entre certaines limites la concentration alcoolique, on modifie en sens inverse et de façon convenable le temps de contact.

Autrement dit, la réaction irréversible :

Cénapses lipoprotéidiques $\rightarrow$ Lipides + Protéides

présente au moins un palier thermodynamique qui correspond au plateau de la courbe d'extraction.

Les petites variations de la température du laboratoire affectent de la même manière toutes les opérations d'extraction conduites simultanément. La confrontation des chiffres de lipides extraits à froid obtenus chez un même animal, par contre, fait apparaître quelques différences systématiques suivant les époques de l'année. En voici les raisons: le temps de contact que nous avons adopté est de 15 heures; l'éther alcoolisé est mis en présence du sérum le soir et la séparation est faite le lendemain matin. Les différences d'action de la température s'exerçant pendant la nuit sont particulièrement sensibles de l'été à l'hiver.

De notre analyse des facteurs physico-chimiques de l'extractibilité il ressort que les substances qui favorisent l'extraction possèdent deux propriétés : elles abaissent notablement la tension interfaciale sérum-éther ; elles sont solubles dans l'éther.

Or l'une et l'autre de ces propriétés sont fonction de la température.

L'expérience montre qu'à la température de 4° l'extraction étherée est augmentée par l'alcool comme elle l'est à 20° : mais les paramètres qui la définissent sont différents.

À 4°, la concentration critique est plus élevée et l'ordonnée du plateau est moindre. L'extraction est paresseuse : elle se déclenche plus tard et la quantité de lipides libérés est moins grande.

Nous retrouverons ces phénomènes beaucoup plus accentués lorsque nous étudierons les sérums d'animaux malades et les sérums sains après conservation.

L'équilibre thermodynamique qui s'établit entre les lipides extraits à froid par l'éther alcoolisé et ceux qui restent combinés aux protéides est donc fonction de la température.

Résultats exprimés en mgr. de lipides pour 25 cc. de sérum de génisse
 + 25 cc. d'éther
 + n cc. d'alcool éthylique

TABLEAU I

Volume d'alcool	1 cc. 5	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.
t = 20°	7.5	19.5	40.0	37.0	30.0	28.0
t = 4°	6.9	13.0	23.6	19.0	13.6	12.0

TABLEAU II

Volume d'alcool	1 cc. 7	2 cc.	2 cc. 5	3 cc.	4 cc.	5 cc.
t = 20°	12.9	28.6	35.9	31.8	23.2	13.8
t = 4°	8.7	14.1	18.3	22.5	20.4	18.0

Or celle-ci agit sur 3 facteurs qui sont :

1° — La solubilité de l'éther dans l'eau et dans l'eau alcoolisée.

Les chiffres extraits des tables de constantes physiques permettent d'établir que l'influence de la température sur ce facteur est insignifiante. Nous la négligerons.

2° — La tension interfaciale sérum-éther.

3° — L'activité chimique du mélange éther-alcool vis-à-vis du système lipoprotéidique du sérum.

L'abaissement de la température diminue la grandeur de ces deux facteurs. Mais, tandis que la diminution de la tension interfaciale sérum-éther favorise l'extraction des lipides la diminution d'activité chimique de l'éther alcoolisé lui est défavorable. Dans la majorité des cas c'est ce dernier qui l'emporte en valeur absolue.

Nous verrons que dans certains cas le sens du phénomène résultant peut s'inverser et que l'extraction peut être favorisée par un abaissement de température.

Nous ajouterons que la mise en liberté des lipides par l'éther alcoolisé est lente, progressive et dépend de tous les états par lesquels a passé le système.

L'exemple suivant va nous le prouver :

Déterminons les quantités de lipides extraits de 25 cc de sérum par 25 cc d'éther + n cc d'alcool éthylique, n correspondant à l'optimum d'extraction, pour les températures et les temps de contact suivants :

15 heures à 4°,
14 heures à 4° + 1 heure à 20°,
15 heures à 20°.

Volume d'alcool	1 cc.	3 cc. 5	4 cc.	4 cc. 5
15 heures à 20°	4.8	81.1	82.8	83.8
14 heures à 4° + 1 heure à 20°		36.2	66.9	47.8
15 heures à 4°		11.6	45.7	20.4

Les chiffres obtenus dans la deuxième série sont intermédiaires entre ceux des deux séries extrêmes.

Ainsi dans l'exemple que nous venons de donner, le mélange alcoolo-éthéré agissant pendant 14 heures à 4° sur le sérum a extrait une notable partie des lipides. On pourrait croire qu'une heure à 20° suffit, le phénomène étant largement amorcé, à faire passer la quantité de lipides extraite du maximum atteint pour 4° au maximum pour 20°. On voit qu'il n'en est rien et que le processus préparatoire lui-même dépend de toutes les conditions qui définissent le système (temps, température, concentration alcoolique).

CONCLUSIONS

L'extractibilité des lipides sériques par l'éther alcoolisé est fonction de la température. Pour le sérum frais, elle diminue quand la température s'abaisse.

Le terme auquel aboutit le phénomène d'extraction n'est donc pas indépendant des facteurs extrinsèques. Il est fonction du temps de la réaction et de la température à laquelle elle s'effectue à chaque instant.

II

CONCENTRATION EN IONS HYDROGENE

Nous avons établi que l'extractibilité des lipides sériques par l'éther à froid n'était pas augmentée par la seule action d'un changement de la concentration en ions hydrogène [1].

Les quantités de lipides extraites par l'éther dans tout l'intervalle de pH étudié (1.7 à 13.3) étant minimes, l'imprécision des mesures ne permet pas de savoir comment varie l'énergie des liaisons protéides-lipides avec l'activité des ions hydrogène.

Aussi avons-nous repris l'étude de l'extraction des lipides par l'éther en présence de petites quantités d'alcool en fonction de ce facteur. La comparaison, portant sur des extraits lipoïdiques beaucoup plus importants, permet une étude quantitative du phénomène.

TECHNIQUE

Dans des ampoules à décanter réparties en un certain nombre de groupes, on introduit 25 cc de sérum et 25 cc d'éther. Pour chaque groupe, on ajuste le pH du contenu des ampoules à une valeur déterminée par introduction, sous un volume constant de 5 cc, de soude ou d'acide sulfurique en solution normale ; on ajoute alors des quantités d'alcool comprises entre 0 et 6 cc.

Après un certain temps de contact, la phase éthérée est séparée, le solvant évaporé et l'extrait lipoïdique pesé suivant la technique habituelle.

Le pH est déterminé au moyen des électrodes d'antimoine de VLES [2] montées en différentiel.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus offrent un grand intérêt.

Les caractéristiques de la courbe d'extraction, l'ordonnée du plateau en particulier, varient beaucoup avec l'activité des ions hydrogène. L'extractibilité présente un maximum pour

une valeur du pH voisine de celle du sérum normal, c'est-à-dire 7.5. Du côté acide il y a diminution progressive de la quantité de lipides extraite à l'optimum. Lorsque le pH atteint 4, l'action combinée de l'acide et de l'alcool entraîne la coagulation du sérum et la dénaturation des protéides.

Du côté alcalin, l'extractibilité ne commence à diminuer que vers $\text{pH} = 9$ et atteint vers 9,5 un minimum dont la valeur est souvent inférieure au dixième de celle du sérum pur. Ce minimum se maintient à peu près en plateau sur une échelle de deux unités de pH. Vers 11,5 la courbe d'extractibilité en fonction du pH croît à nouveau assez brusquement. Entre 12,0 et 13,5, pH extrême étudié, la quantité de lipides extraite à l'optimum est à peu près la même que pour le sérum pur.

Ces résultats, établis chez la génisse, ont été retrouvés chez le cheval.

Irréversibilité du phénomène. — Les changements que produisent dans l'équilibre lipoprotéidique du sérum la soude ou l'acide sulfurique ne sont pas réversibles.

L'addition de 1 cc. de base ou d'acide $\frac{\text{N}}{1}$ à 25 cc. de sérum étant suffisante pour diminuer considérablement les taux des lipides extraits à froid, on détermine ceux-ci dans les conditions suivantes :

1° Sérum normal ($\text{pH} = 7.4$);

EXTRACTIBILITE DES LIPIDES SERIQUES PAR L'ETHE

Résultats exprimés en mgr. de lipides

	ACIDE SULFURIQUE $\frac{\text{N}}{1}$										
	2 cc.			1 cc.			0 cc. 4			0 cc.	
pH.	5.2			6.2			6.8			7.5	
Nb. de cc. d'alcool	3	4	5	3	4	5	3	4	5	3	4
Mgr. de lipides	7.8	9.4	10.4	9.4	6.9	28.0	50.5	48.3	49.1	56.1	56.6

2° Sérum additionné de 1 cc. d'acide sulfurique $\frac{N}{1}$ (pH = 6.0);

3° Sérum additionné de 1 cc. de soude $\frac{N}{1}$ (pH = 9.4).

Les phases sérique et éthérée sont séparées après 15 heures.

4° Sérum additionné de 1 cc. d'acide sulfurique $\frac{N}{1}$ et 30 minutes après de 1 cc. de soude $\frac{N}{1}$.

Les phases sérique et éthérée sont séparées 15 heures après l'introduction de soude.

5° Sérum additionné de 1 cc. de soude $\frac{N}{1}$ et 30 minutes après de 1 cc. d'acide sulfurique $\frac{N}{1}$.

Les phases sérique et éthérée sont séparées 15 heures après l'introduction d'acide.

Dans chacune de ces séries d'expériences, le contenu de chaque ampoule à décanter était ajusté au même volume par addition d'eau.

Les quantités maxima de lipides extraites dans chacun de ces essais étaient les suivantes :

N° de l'essai	1°	2°	3°	4°	5°
Mgr. de lip. extr.....	68.6	27.2	19.4	32.5	20.2

Les quantités de lipides extraites du sérum acidifié ou alcalinisé puis ramené à la neutralité après 30 minutes et soumis à l'extraction alcoolo-éthérée

PRESENCE DE PETITES QUANTITES D'ALCOOL EN FONCTION DU pH

25 cc de sérum de génisse

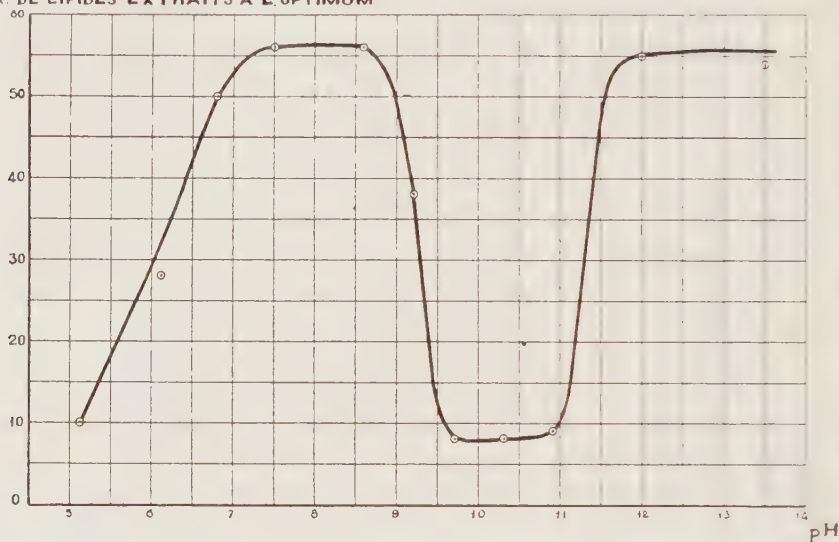
+ 25 cc d'éther

+ n cc d'alcool éthylique

SOUDE $\frac{N}{1}$																	
0 cc. 4			0 cc. 7		1 cc.			1 cc. 5		2 cc.		3 cc.			5 cc.		
8.9			9.2		9.7			10.3		10.9		12.0			13.5		
3	4	5	3	4	3	4	5	3	4	3	4	3	4	5	3	4	5
6.5	56.2	54.7	29.1	38.0	2.9	4.4	7.5	4.7	8.1	4.3	9.2	46.9	49.7	55.9	46.6	50.2	51.4

pendant 15 heures ne sont pas comparables à celles du sérum normal. Le système lipoprotéidique modifié irréversiblement, garde l'empreinte de son premier changement de pH.

M. ca. DE LIPIDES EXTRAITS A L'OPTIMUM



ESSAI D'INTERPRÉTATION DES FAITS

Une explication un peu générale de ce phénomène nous paraît difficile à donner dans l'état actuel de la question. L'étude n'en est qu'amorcée et doit être poursuivie. Nous nous proposons en particulier de rechercher comment se comportent les différentes substances qui favorisent l'extraction et quelle relation peut exister entre leur solubilité dans l'eau et l'allure du phénomène.

Nous sommes enclins à penser qu'il est en rapport avec l'« eau liée » aux protéides.

Ce problème n'est pas nouveau mais son étude a été reprise depuis quelques années à Strasbourg par NICLOUX, AMBARD, FONTÈS et leurs élèves. Nous allons exposer, parmi les résultats obtenus, ceux qui nous intéressent plus particulièrement.

a) Travaux des auteurs strasbourgeois sur l'« eau liée ».

NICLOUX [3] a montré avec GOSSELIN que, chez les animaux aquatiques immergés dans l'eau faiblement alcoolisée,

la teneur en alcool de l'eau des tissus est toujours inférieure à celle du milieu extérieur, dans lequel l'animal vit.

L'auteur admet que la diffusion seule préside à l'imprégnation des tissus et que, l'équilibre une fois atteint, la teneur en alcool de l'eau d'un tissu est identique à celle du milieu extérieur. Dans ces conditions, tout se passe comme si une partie de l'eau était cachée et imperméable à l'alcool. La fraction de l'eau dans laquelle l'alcool ne diffuse pas doit être supposée liée aux protéides.

L'hypothèse émise par FONTÈS [4] d'une perméabilité partielle des branchies des animaux aquatiques est trop particulière et ne peut expliquer d'autres faits établis par AMBARD et DEVILLER [5].

L'ultrafiltrat du plasma sanguin est plus riche en chlore que le plasma lui-même, compte tenu du volume occupé par les protéides. Celui-ci étant de 75 p. 1000, la teneur en chlore du plasma est inférieure de 85 p. 1000 à celle de l'ultrafiltrat. Il existe donc des « espaces non solvants » pour le chlore. Leur volume se rapproche de celui qu'on peut calculer à partir du taux des protéides lorsque le plasma est au voisinage de son point isoélectrique. Par alcalinisation, au contraire, il augmente jusqu'à atteindre 310 p. 1000 du volume du plasma.

L'espace non solvant dépend donc étroitement de l'ionisation des micelles protéidiques ; celles-ci jouent le rôle de centres répulsifs pour le chlore (AMBARD et DEVILLER [6]). La concentration en chlore, nulle pour la couche aqueuse qui est au contact de la micelle, s'accroît avec la distance suivant un gradient de solubilité.

b) *Relations entre l' « eau liée » et l'allure des courbes d'extraction.*

Ces travaux s'intègrent dans un ensemble de faits qui établissent qu'une partie de l'eau des tissus a des propriétés tout à fait spéciales : elle ne gèle pas à 0° (*), sa tension de vapeur est infime, son pouvoir solvant est très diminué.

(*) MOLLIARD et MATRUCHOT [7] ont établi qu'à -10°, l'eau peut encore franchir les parois des cellules végétales pour aller se congeler dans les méats

La proportion de l'eau dissimulée dans les tissus varie essentiellement avec le pH ; elle augmente avec celui-ci.

Or l'examen des courbes d'extraction nous apprend que tout se passe comme si l'eau qui entoure les protéides était imperméable à l'éther dont la solubilité aqueuse est cependant loin d'être négligeable (de l'ordre de 5 p. 100 à la température ordinaire) ; il en va de même pour l'éther faiblement alcoolisé.

Lorsque la concentration critique est atteinte, l'alcool détruit le complexe formé par les cénapses lipoprotéidiques avec l'eau qui, redevenue libre, recouvre son pouvoir solvant.

L'alcool doit se comporter vis-à-vis de l' « eau imperméable » comme une substance avec seuil.

Que se passe-t-il lorsqu'on fait varier le pH ?

On sait que les acides et les alcalis dilués sont des agents d'hydratation ; l'augmentation de l'espace non solvant pour le chlore en est une preuve. Lorsqu'on alcalinise plus fortement, il se produit au contraire une déshydratation progressive.

L'allure de l'extractibilité en fonction du pH reflète bien ces variations de l'état d'hydratation des micelles lipoprotéidiques. L'extractibilité commence à diminuer lorsque le pH croît puis elle augmente à nouveau. Quand il y a équilibre entre les processus d'hydratation et de déshydratation, c'est-à-dire (pour le sérum de génisse étudié) vers $\text{pH} = 13,0$, les quantités de lipides extraites sont les mêmes que pour le sérum non alcalinisé.

Notre hypothèse, d'après laquelle l'allure de l'extractibilité est étroitement liée à l'état d'hydratation des protéides, c'est-à-dire à la proportion d' « eau liée » par rapport à l'eau totale du sérum, a l'avantage d'expliquer encore un phénomène que nous avons souvent constaté.

Le poids des lipides extraits à froid d'un sérum dilué au demi avec une solution saline isotonique est quelquefois égal

cellulaires où la température est la même et la concentration saline plus forte qu'à l'intérieur des cellules (puisque'il y a exosmose). Ce phénomène, qui n'est pas conforme à la loi de constance de la température de solidification, oblige à admettre que l'eau existe sous différents états physico-chimiques.

à la moitié de celui qu'on extrait dans les mêmes conditions du sérum non dilué. Mais dans certains cas il peut être beaucoup plus faible. Le rapport d'extraction est considérablement diminué.

Ce phénomène doit être en rapport avec l'hydratation des protéides qui augmente avec la dilution jusqu'à dépasser la valeur maxima pour laquelle l'extraction est encore possible.

CONCLUSIONS

Nous avons montré que l'énergie des liaisons lipides-protéides est fonction du pH et par suite de la charge électrique des protéides.

La quantité de lipides extractibles par l'éther additionné de petites quantités d'alcool est maxima au voisinage de la neutralité. Elle diminue avec le pH mais lorsque celui-ci devient inférieur à 4, l'action combinée de l'acide et de l'alcool produit une dénaturation rapide des protéides. Lorsque le pH augmente, elle diminue progressivement, puis vers $\text{pH} = 9$ elle décroît brusquement jusqu'à un minimum qui peut être inférieur au dixième de sa valeur normale. Vers $\text{pH} = 11,5$ elle augmente à nouveau et reprend sa valeur normale entre 12,0 et 13,5.

Nous pensons que ce phénomène est en relation avec l'eau liée aux protéides et imperméable aux solvants des graisses. On sait, en effet, que les acides et les alcalis dilués se comportent comme des agents d'hydratation. Ces mêmes substances, pour des concentrations plus élevées, produisent au contraire une déshydratation.

Cette hypothèse, qui est en bon accord avec les faits observés, nous semble susceptible d'expliquer convenablement l'allure si particulière de l'extractibilité en fonction du pH.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — DELAGE (B.): Extractibilité des lipides sériques par l'éther en fonction du pH.
Bull. Soc. Chim. biol., 1936, 18, 1600.
 - 2 — VLES (F.): Notes sur l'électrode d'antimoine. Montage pratique en différentiel.
Arch. Phys. biol., 1927, 6, 92.
 - 3 — NICLOUX (M.): L'eau des tissus: Possibilité de mettre en évidence une eau imperméable à l'alcool éthylique; sa fixation par les protéides; sa mesure, ses variations.
Bull. Soc. Chim. biol., 1934, 16, 822.
 - 4 — FONTES (G.): Discussion de la notion de l'eau imperméable à l'alcool.
C. R. Soc. Biol., 1936, 121, 1465.
 - 5 — AMBARD (L.) et DEVILLER: Espaces non solvants des liquides albumineux.
C. R. Soc. Biol., 1935, 118, 674.
 - C — AMBARD (L.) et DEVILLER: Répartition des électrolytes dans une solution d'albumine.
C. R. Soc. Biol., 1935, 119, 575.
 - 7 — MOLLIARD (M.) et MATRUCHOT: *Revue de Botanique*, 1902, 14, 522.
-

QUATRIÈME PARTIE

LE SYSTÈME LIPOPROTÉIDIQUE DU SÉRUM DANS LES ÉTATS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES



CHAPITRE I

LE RAPPORT D'EXTRACTION ÉTUDE DE CE PARAMÈTRE CHEZ L'ANIMAL SAIN

La troisième partie de ce travail a été consacrée à l'étude du système lipoprotéidique d'un sérum déterminé.

Les substances provoquant l'extraction, nous l'avons montré, diffèrent par leur concentration critique mais le maximum de lipides extrait est le même pour toutes.

De plus, le plateau de la courbe d'extraction s'étend sur une échelle d'abscisses assez importante ; ce tronçon de la courbe s'oppose ainsi plus nettement encore à la montée brusque, discontinue qui représente l'évolution du phénomène.

Ce plateau possède donc un ensemble remarquable de propriétés :

- 1°) Il est large, ce n'est pas un maximum en pointe.
- 2°) Il a la même valeur pour toute une série de composés assez différents par leur fonction chimique.
- 3°) Il ne dépasse pas cette valeur quand on prolonge le temps de contact entre les phases aqueuse et éthérée.

Le plateau d'extraction représente donc un palier thermodynamique de la réaction irréversible :

Complexes lipoprotéidiques $\longrightarrow$ Lipides + Protéides.

Nous appellerons RAPPORT D'EXTRACTION (*) le rapport entre le maximum de lipides extractibles à froid par l'éther en présence de quantités d'alcool assez faibles pour ne pas dénaturer les protéides et les lipides totaux [1].

Ce rapport est la mesure de l'équilibre qui s'établit entre des lipides assez labiles pour être libérés par l'éther alcoolisé et les lipides qui, plus énergiquement unis aux protéides, restent liés avec ceux-ci dans la phase aqueuse du sérum.

Ce paramètre ne dépend pas du catalyseur d'extraction puisqu'il est le même pour tous. Il mesure la stabilité à un réactif déterminé du système lipoprotéidique du sérum dont il constitue une importante caractéristique.

INFLUENCE DES SAIGNEES ESPACEES CHEZ L'ANIMAL SAIN

La première question à résoudre est de savoir comment se comporte ce paramètre chez un animal sain, dans des conditions physiologiques constantes.

Les chiffres que nous donnons se rapportent à trois animaux d'espèces différentes, en bonne santé, soumis à une nourriture à peu près uniforme et maintenus au repos à l'étable.

Ils nous montrent que le rapport d'extraction conserve une constance tout à fait remarquable, alors que les lipides totaux présentent des variations assez notables.

Il serait important de connaître l'influence de la température extérieure, de l'âge de l'animal, de sa nourriture, de son activité physiologique, etc...

(*) Dans la suite de cet ouvrage, nous désignerons par R le rapport d'extraction.

SAIGNEES ESPACEES CHEZ L'ANIMAL SAIN

ANIMAL	Date de la saignée	Lipides extractibles à froid pour : 25 cc. sérum + 25 cc. éther + Ncc. Alc.						Lipides totaux de 25 cc. de sérum	Rapport d'ex- traction R
		1 cc 5	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc		
CHEVAL	29- 8-1934		52.0	54.3	56.0	54.0	37.5	82.3	0.67
	12- 9-1934	7.5	19.5	42.3	42.2	27.0	25.0	63.6	0.66
	19-10-1934		18.6	40.0	37.0	37.4	30.0	58.0	0.68
	20-11-1934	4.7	20.2	39.3	34.0			58.3	0.67
MOUTON	20-11-1935		7.0	10.1	28.1	14.3	12.8	36.6	0.77
	3-12-1935		4.4	14.2	22.8	11.2	16.4	30.9	0.74
	16-12-1935		6.1	22.7	25.6	17.7	13.0	34.0	0.75
	27-12-1936			55.2	57.2	62.1	58.7	78.8	0.78
GENISSE	4- 1-1937				54.6	54.4		69.3	0.78
	10- 2-1937			55.5	55.2			71.5	0.78
	1- 3-1937			81.1	82.8	83.8		106.0	0.79

INFLUENCE DES SAIGNEES REPETEEES CHEZ L'ANIMAL SAIN

Nous avons ensuite étudié l'influence des saignées répétées chez le cheval :

L'animal a été soumis à deux saignées de quatre litres chacune par semaine.

Les lipides totaux ont augmenté suivant une courbe qui n'est devenue nettement ascendante qu'à la huitième saignée. A la neuvième saignée, ils avaient presque atteint trois fois leur valeur première (*).

Les lipides extractibles à froid suivent assez régulièrement les lipides totaux. On doit noter cependant la réaction qui se produit à la deuxième saignée et que traduit une diminution de R. Dans l'ensemble, ce coefficient varie assez peu.

CONDITIONS DE PRELEVEMENT DU SERUM

Le sérum, nous l'avons vu, (**) est un peu plus riche en lipides au début de la saignée qu'à la fin. Nous avons également noté que, au cours de sa conservation sur le caillot, le sérum s'appauvrit en lipides.

(*) L'appauvrissement du plasma sanguin en protéides est souvent concomitant d'une augmentation des lipides.

Notre étude des saignées répétées chez le cheval confirme des faits déjà établis par Mlle FISHBERG [2] qui montra que, chez le lapin saigné fréquemment et abondamment, la diminution des protéides plasmatiques est compensée par une hyperlipidémie intense pouvant atteindre 40 grs par litre.

Dans ce cas, la perte en protéides plasmatiques est d'ordre mécanique mais elle peut avoir des causes pathologiques. Chez les malades atteints de néphrite ou de néphrose lipoidique, elle s'effectue dans le rein au niveau des corpuscules de MALPIGHI.

Chez les néphrosiques, ce sont surtout des albumines qui passent dans l'urine. Celles qui restent dans le plasma sont beaucoup plus riches en lipides que chez les individus normaux, comme l'ont montré MACHEBŒUF et WAHL [3]. D'autre part, chez ces malades, les albumines sériques, riches en lipides, se diluent par dialyse, à poids égal de protéides, beaucoup plus que les albumines normales.

L'ensemble de ces faits a amené MACHEBŒUF et SANDOR [4] à penser que les lipides liés aux protéides augmentent l'action de ces protéides sur les équilibres de membrane donc sur la pression de STARLING. Ils jouent donc un rôle certain dans la lutte de l'organisme contre l'apparition des œdèmes.

(**) Voir 1^{re} partie, chap. 1.

SAIGNEES REPETÉES CHEZ LE CHEVAL

N ^{os} des saignées	Lipides extractibles à froid 25 cc. sérum + 25 cc. éther + N cc. Alcool éthylique							Lipides totaux de 25 cc. de sérum		Rapport d'extraction R
								Chiffres expérimentaux	Moyenne	
	1 cc 5	2 cc	2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc				
I	2.6	31.6	37.7	36.0	37.7			44.7 42.6	43.6	0.86
II	16.8	31.6	32.8	32.5	33.2	25.4		50.9 51.2	51.1	0.65
III	6.8	43.0	46.0	42.4	47.2	33.7		53.8 55.4	54.6	0.86
IV	4.0	20.8	33.2	31.2	32.8	19.2		39.0 38.3	38.7	0.85
V	28.3	37.4	40.4	43.4	46.2	38.7		47.4 44.0	45.7	0.93
VI	8.5	49.9	53.0	54.1	55.6	49.1		62.0 60.1	61.0	0.91
VII	9.4	34.0	36.2	42.0	43.4	37.9		54.3 52.5	53.4	0.81
VIII	9.1	63.2	68.1	69.0	72.0	55.4		81.3 81.8	81.6	0.88
IX	11.1	98.3	101.2	102.4	104.9	112.3		118.6 116.8	117.7	0.95

Nous avons désiré connaître le comportement du rapport d'extraction dans ces conditions.

Les chiffres de l'expérience précédemment rapportée (*) sont ceux des lipides totaux. Ils sont relatifs au sérum du cheval dont il est question dans ce chapitre, chez lequel l'influence des saignées répétées a été étudiée.

Protocole d'une expérience

On prélève à un cheval 4 litres de sang que l'on récolte dans deux vases à saignée I et II : la moitié du sérum de chacun des récipients est séparée du caillot au bout de 24 heures, l'autre moitié au bout de 48 heures. On analyse les lipides extractibles à froid et les lipides totaux.

Les résultats sont rapportés à 25 cc de sérum.

L. T. lipides totaux
R. rapport d'extraction

I	Lipides extraits à froid pour $\left. \begin{array}{l} 25 \text{ cc sérum} \\ + 25 \text{ cc éther} \\ + 25 \text{ cc alcool éthylique} \end{array} \right\}$						L. T.	R
cc d'alcool	1 cc 5	2 cc	2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc		
Sérum 24 H. sur caillot	8.5	49.9	53.0	54.1	55.6	49.1	62.0 60.1	0.91
Sérum 48 H. sur caillot		47.5	53.8	48.5			56.5	0.95

II	Lipides extraits à froid						L. T.	R
cc d'alcool	1 cc 5	2 cc	2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc		
Sérum 24 H. sur caillot	4.8	45.0	49.5	49.6	53.7	35.6	56.2 58.5	0.93
Sérum 48 H. sur caillot		46.2	47.7	49.0			54.1	0.91

La lecture de ce tableau montre que les lipides extraits à froid varient dans le même sens que les lipides totaux, le rapport d'extraction restant très sensiblement constant.

On peut donc penser qu'au cours de ces légères variations de la lipidémie, le mode d'union des lipides avec les protéides ne varie pas.

(*) Voir 1^{re} partie, chap. 1.

CONCLUSIONS

De précédentes recherches nous ont permis de montrer que le plateau de la courbe d'extraction était caractéristique d'un sérum déterminé. Rapportée aux lipides totaux, la valeur du maximum de lipides qu'on peut extraire à froid par l'éther alcoolisé sans dénaturer les protéides constitue une mesure de la stabilité des lipides dans les cénapses lipoprotéidiques d'un sérum donné. Nous l'avons appelée *rapport d'extraction*.

Les chiffres que nous venons de donner montrent que chez un animal en bonne santé ce paramètre reste très constant et tout à fait indépendant des variations concomitantes des lipides totaux. Sa valeur moyenne, généralement égale ou supérieure à $2/3$, est une caractéristique biologique de l'état de santé.

On peut dire avec beaucoup de certitude qu'un abaissement assez important du rapport d'extraction est le signe d'une maladie en évolution ou d'une guérison clinique plus ou moins récente, comme nous allons maintenant l'établir.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — DELAGE (B.) : Extractibilité des lipides sériques par l'éther en présence d'alcool à froid en relation avec l'état de santé et de maladie.
Bull. Soc. Chim. biol., 1935, 17, 938.
- 2 — FISHER (Mlle E. H.) : The relation of the serum proteins and lipids to the osmotic pressure.
J. biol. Chem., 1929, 81, 305.
- 3 — MACHEBEUF (M.) et WAHL (R.) : Recherches biologiques sur la néphrose lipéidique. 1^{er} mémoire.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 205.
- 4 — MACHEBEUF (M.) et SANDOR (G.) : Recherches biologiques sur la néphrose lipéidique. 5^e mémoire.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 745.



CHAPITRE II

MALADIE VACCINALE

Le système lipoprotéidique du sérum étant le support des propriétés biologiques essentielles du plasma circulant, sa structure et ses propriétés physico-chimiques doivent subir des transformations très notables au cours des états pathologiques. C'est à l'examen de ce problème que nous nous sommes attachés.

Trop peu de recherches ont été tentées dans cette voie. Citons cependant celles de VLES [1] sur les points isoélectriques des protéides sériques dans différentes maladies, le cancer en particulier, celles de LECOMTE DU NOÛY [2] sur la chute de tension superficielle du sérum en fonction de la dilution chez les animaux normaux et immuns.

Etudiant un autre milieu que le sérum sanguin, nous avons montré avec G. BLANC (1934) que des mesures physiques (tension superficielle) faites sur des suspensions provenant du broyage d'organes de cobayes permettent de déterminer si ces animaux sont sains ou en pleine réaction de typhus murin [3].

Pour l'étude que nous voulions entreprendre, nous nous sommes adressés à des animaux assez gros pour que l'état physico-chimique de leur sang ne fût pas sensiblement modifié par un prélèvement de 400 à 500 cc de sang. Ce volume en effet correspond aux 200 à 250 cc de sérum nécessaires pour tracer la courbe d'extraction, doser les lipides totaux et étudier d'autres substances du sérum. Pour tâcher de mettre

en évidence un phénomène dans toute sa netteté, nous avons cherché une infection donnant une réaction rapide et brutale.

Les génisses qui servent à préparer le vaccin jennérien réunissaient toutes ces conditions; ces animaux furent l'objet de nos premières recherches [4] sur les modifications de l'équilibre lipoprotéidique au cours de la maladie.

I

LE SYSTEME LIPOPROTÉIDIQUE DU SÉRUM AU COURS DE L'INFECTION VACCINALE MASSIVE

TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Schéma de la préparation du virus vaccinal

Voici les grandes lignes du traitement auquel on soumet la génisse pour l'obtention du vaccin jennérien.

Après être resté en observation une dizaine de jours, l'animal est rasé et badigeonné avec une émulsion de virus vaccinal. L'inoculation, faite à l'aide d'un scarificateur à lames multiples, affecte environ le tiers de la surface cutanée totale.

Au cinquième jour, l'éruption vaccinale est à son acmé. Les nombreuses pustules formées sont récoltées à l'aide d'une curette. La large plaie cutanée ainsi créée s'ensemence de germes pyogènes dont l'envahissement ébranle rapidement la résistance d'un organisme déjà diminuée par la maladie vaccinale. Au bout de peu de jours (trois à cinq après la récolte, en moyenne) l'animal commence à se cachectiser et, dans le délai de une à deux semaines, il meurt intoxiqué par les poisons microbiens.

Epoque des saignées

Le premier prélèvement de sang (S) est fait chez l'animal sain.

Nous avons pris l'habitude d'effectuer cette opération plusieurs jours avant l'inoculation pour laisser à l'animal

l'intégralité de ses moyens de défense dès le début de la maladie.

Une seconde saignée est faite soit le jour de la récolte de la pulpe vaccinale (V), soit un certain nombre de jours après ($V + n_j$) ; n est généralement de l'ordre de 2 à 10 jours.

Certains animaux ont été saignés trois fois aux époques (S), (V), ($V + n_j$).

EVOLUTION DES LIPIDES

Nous avons comparé quantitativement et qualitativement les lipides sériques chez des génisses avant l'inoculation de virus vaccinal et au cours de la maladie. La première série de recherches (1934) comportait sept animaux [4], la seconde (1937) quatorze [5].

Nous allons donc étudier successivement les lipides totaux et le rapport d'extraction, enfin, nous comparerons la composition chimique des lipides extraits à froid à celle des lipides totaux.

I

METABOLISME DES LIPIDES

Dans la première série, il manque quelques déterminations de l'extrait lipoïdique total.

La seconde comporte dans chaque cas le dosage du cholestérol total, de l'insaponifiable X et des acides gras totaux. Leur somme représente à très peu près les lipides totaux.

Lipides totaux. — Chez les quatorze animaux qui constituent la deuxième série, on a déterminé la somme $IT + AG$.

Le 1er tableau ci-dessous indique les valeurs moyennes maxima et minima de $IT + AG$ à la première et à la dernière saignée.

Le 2e donne les valeurs moyennes et extrêmes du rapport $IT + AG$ de la dernière à la première saignée.

(IT+AG) (*) par litre de sérum

	Moyenne	Maximum	Minimum
Première saignée	3 gr. 19	3 gr. 73	2 gr. 60
Dernière saignée	1 gr. 76	2 gr. 35	1 gr. 02

Rapport $\frac{(IT+AG) \text{ à la dernière saignée}}{(IT+AG) \text{ à la première saignée}}$

Moyenne	Maximum	Minimum
0.55	0.84	0.45

On voit que la diminution des lipides sériques au cours de l'infection, est très notable et que le chiffre de 2 gr. 50 sépare nettement la lipidémie de l'ensemble des génisses saines de celui des génisses malades. (Une exception : la génisse 62 qui s'est montrée aussi anormale au point de vue du rapport d'extraction, comme nous le verrons plus loin).

Ainsi, au cours de la maladie les lipides totaux diminuent à peu près de moitié ; la variation est donc fort importante.

La question se posait de savoir si cette diminution affectait également la fraction insaponifiable et les acides gras. Nous avons donc calculé la proportion d'une de ces fractions (insaponifiable total) par rapport à l'ensemble IT + AG à chaque saignée.

Ce rapport $\frac{IT}{IT + AG}$ baisse à chacune des saignées successives.

La valeur moyenne est 0.435 chez l'animal sain et 0.380 chez l'animal malade, soit une diminution de 14 p. 100.

(*) Abréviations utilisées :

S saignée faite avant l'inoculation (chez l'animal sain).

V saignée faite le jour de la récolte de la vaccine (5 jours après l'inoculation).

V + nj. saignée faite n jours après la récolte de la vaccine.

AG acides gras totaux.

IT insaponifiable total.

Chol. Cholestérol total.

IX Insaponifiable X de LEMELAND (IT=IX+Chol.).

R rapport du maximum de lipides extractibles à froid à la somme (IT+AG) ou Rapport d'extraction.

Cette somme (IT + AG) représente à très peu près les lipides totaux.

Ainsi la diminution que subissent les lipides totaux est bien plus sensible pour la fraction insaponifiable que pour les acides gras ; l'expérience nous a même montré qu'elle est plus élevée pour le cholestérol que pour l'insaponifiable total.

Au cours de la maladie, la proportion d'insaponifiable total catabolisée est plus considérable que celle d'acides gras.

Le fait apparaît plus net encore si l'on rapporte IT non plus à la somme IT + AG mais à AG seulement.

Numéro des génisses	IT	IT	IT	IT+AG	IT+AG	IT+AG
	IT+AG (1)	IT+AG (2)	IT+AG (3)	(1)	(2)	(3)
57	0.46	0.38		68.9	39.1	
58	0.44	0.40	0.34	71.7	42.3	34.5
59	0.45	0.39		89.9	57.0	
60	0.43	0.38	0.39	80.7	56.1	51.0
61	0.44	0.42	0.37	90.3	60.6	40.7
62	0.41	0.33		93.2	78.7	
63	0.40	0.38		72.5	58.7	
64	0.42	0.36		65.0	25.5	
66	0.44	0.41		84.4	47.6	
67	0.43	0.41		68.9	30.9	
69	0.43	0.41		81.6	39.4	
70	0.42	0.39		90.5	49.0	
71	0.42	0.39		77.6	40.4	
Moyennes	0.435	0.38		79.6	44.8	

II

VARIATIONS DU RAPPORT D'EXTRACTION

La détermination des lipides extractibles à froid par l'éther en présence de petites quantités d'alcool, nous a permis de calculer le rapport d'extraction.

De cette étude faite sur 21 génisses, se dégage une conclusion d'une absolue généralité :

À un certain stade de la maladie, les lipides extractibles à froid diminuent considérablement; à tel point que l'extraction étherée est sensiblement la même en présence ou en l'absence d'alcool; la courbe d'extraction est aplatie sur l'axe des abscisses.

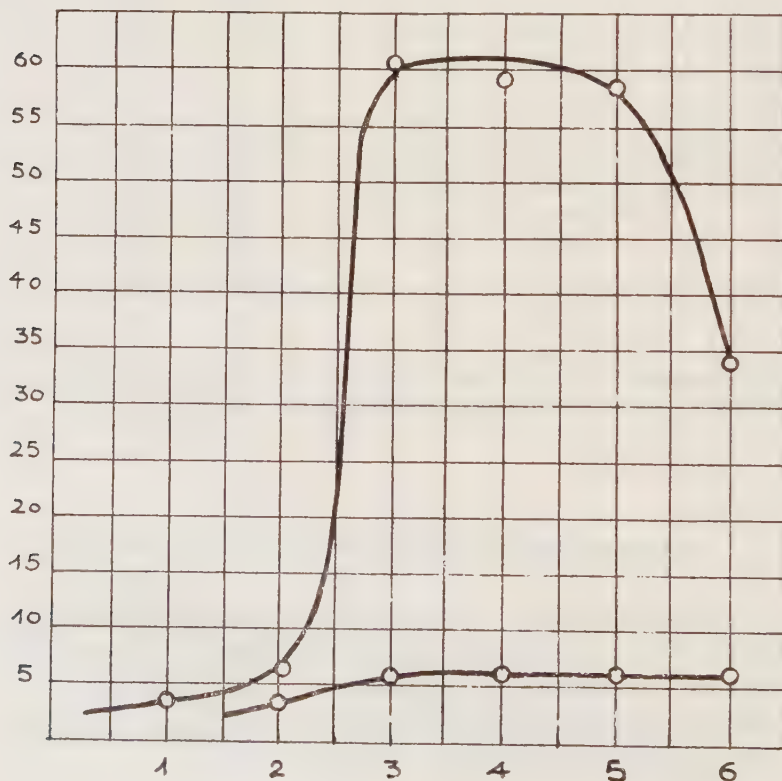
L'ampleur du phénomène est tellement marquée que, malgré la diminution des lipides totaux, celle que subit le rapport d'extraction est encore plus considérable.

Cc. D'ALCOOL

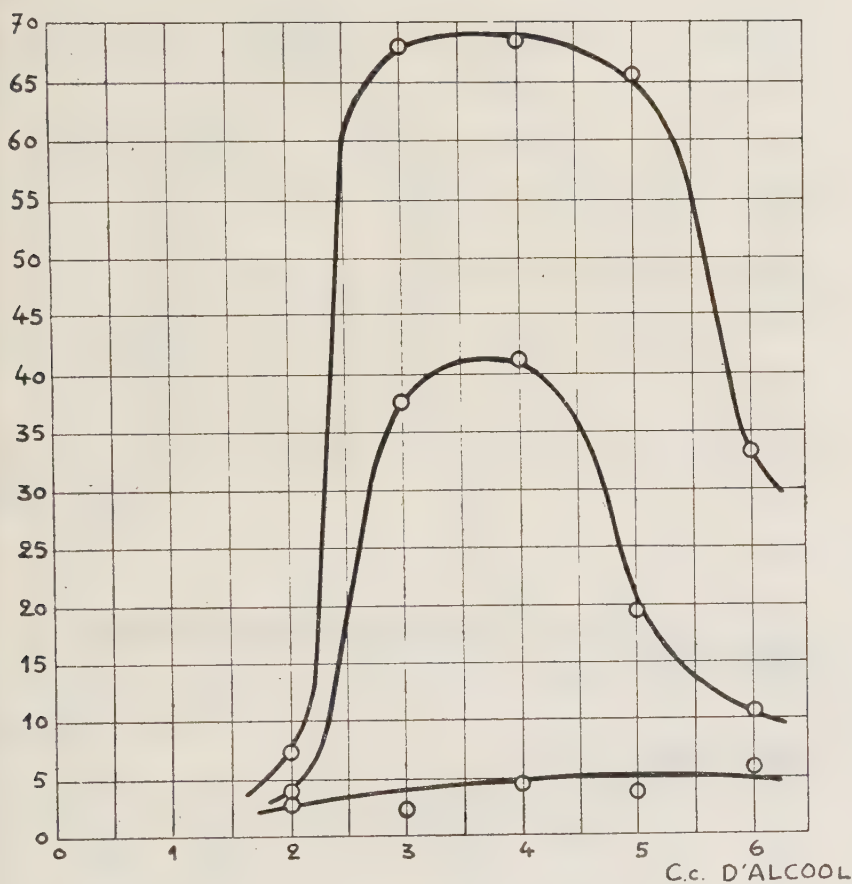
GÉNISSE 28

COURBE SUPÉRIEURE : AVANT L'INOCULATION
COURBE INFÉRIEURE : 5 JOURS APRÈS

MGR. DE LIPIDES EXTRAITS



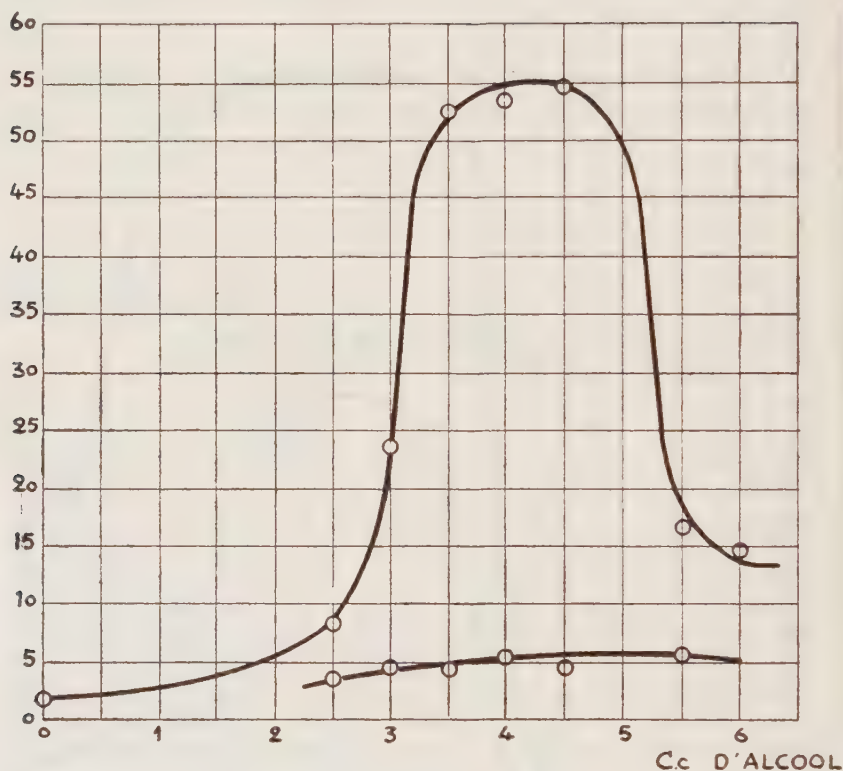
MGR. DE LIPIDES EXTRAITS



GÉNISSE 61

COURBE SUPÉRIEURE :: AVANT L'INOCULATION
COURBE MOYENNE : LE JOUR DE LA RÉCOLTE DE LA VACCINE
COURBE INFÉRIEURE : 5 JOURS APRÈS LA RÉCOLTE DE LA VACCINE

MCG DE LIPIDES EXTRAITS



GÉNISSE 76

COURBE SUPÉRIEURE : AVANT L'INOCULATION
COURBE INFÉRIEURE : 9 JOURS APRÈS

Sa valeur moyenne est 0,64 à la première saignée,
et 0,16 à la deuxième saignée.

C'est-à-dire que R a diminué exactement dans la proportion de 4 à 1.

Examen des cas individuels :

La chute de R est un phénomène absolument général, mais on peut distinguer différentes modalités suivant la valeur initiale de ce paramètre et l'allure de sa décroissance.

1° Dans la très grande majorité des cas, le rapport R chez l'animal sain est élevé (généralement supérieur à 0,67) ; il est faible chez l'animal malade (généralement inférieur à 0,18).

a) Chez certains animaux, cette chute est réalisée au cinquième jour de la maladie (jour de la récolte de la vaccine).

Génisses, 26, 28, 58, 59.

Le coefficient R continue à décroître dans les jours qui suivent (génisse 58).

b) Chez d'autres, l'abaissement de R est net mais peu notable au bout de 5 jours. Sa chute brusque ne s'effectue que dans les jours qui suivent la récolte de la pulpe vaccinale.

Génisses 18, 23, 60, 61.

Le phénomène est quelquefois très rapide ; chez la génisse 60, le coefficient est passé de 0,67 à 0,16 en 48 heures.

c) Ayant constaté ce fait, pour une autre série de génisses, la deuxième saignée ne fut faite que 2 à 8 jours après la récolte de la vaccine.

Génisses 63, 66, 67, 69, 70, 76.

Là encore on observe le phénomène dans toute sa netteté.

2° Chez certaines génisses la valeur première de R (avant inoculation de virus vaccinal) est faible (généralement voisine de 0,30). Il s'agit peut être d'animaux ayant eu antérieurement une autre maladie. Nous reviendrons sur cette question.

	Epoque de la saignée	R × 100	L.T.	Lipides extraits à } froid pour { 25 cc sérum 25 cc éther N cc alcool éthylique					
				1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc
3	V			2.2	2.3	3.6	4.5	3.0	4.5
4	V			2.5	2.5	3.3	7.3	3.1	3.9
6	S				3.2		70.3		
8	S V			3.0	3.3	33.3 3.3	52.9 4.1	2.8	2.6
3	S	38	60.3	2.9	3.8	22.6	19.5	11.0	13.0
	V	72	31.1	4.0	4.4	22.5	20.3	9.6	12.0
	V+2 j.	10	30.0	2.3	1.9	2.2	3.0	2.3	2.7
6	S	92	63.2	3.5	1.8	60.6	63.0	61.4	26.2
	V	13	43.6			4.0	5.7		
8	S	73	83.0	3.6	6.7	60.6	59.6	59.3	54.5
	V	20	30.2		3.5	5.8	5.8	5.9	5.8

Génisses	Epoque de la saignée	R×100	IT+AG	Lipides extraits à froid pour : $\left\{ \begin{array}{l} 25 \text{ cc. sérum} \\ 25 \text{ cc. éther} \\ N \text{ cc. alcool éthy} \end{array} \right.$				
				2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.
57	S	30	68.9	4.1	12.6	19.2	20.6	1
	V	15	39.1	5.1	7.2	6.1	6.2	
58	S	67	71.7	5.6	25.3	43.2	47.8	2
	V	17	42.3	4.5	4.9	7.0	7.4	
	V+8 j.	9	34.5	2.2	2.4	2.6	3.2	
59	S	68	89.9	6.8	61.3	60.1	55.8	5
	V	18	57.0			10.5	12.8	1
60	S	83	80.7	7.7	62.0	66.4	61.2	3
	V	67	56.1	6.0	45.2	48.6	26.1	2
	V+2 j.	16	51.0		5.3	7.9	11.3	1
61	S	76	90.3	7.3	68.0	68.6	65.4	3
	V	68	60.6	4.0	37.7	41.1	19.6	1
	V+5 j.	11	40.7	2.9	2.4	4.4	3.7	
62	S	66	93.2		59.9	61.7		5
	V+2 j.	40	78.7		26.0	32.2	17.4	1
63	S	68	72.5		49.0	41.3	37.3	
	V+2 j.	11	58.7		6.0	9.1	10.7	1
64	S	33	65.0		8.8	10.4	21.7	
	V+2 j.	10	25.5		2.2	2.3	2.4	2
66	S	58	84.4		10.1	14.2	39.7	
	V+4 j.	15	47.6		11.7	5.3	9.3	7
67	S	82	68.9		54.2	53.3	56.3	
	V+4 j.	14	30.9		3.5	4.4	4.6	
69	S	58	81.6		29.1	46.9	46.8	1
	V+3 j.	7	49.0			1.8	3.2	3
70	S	75	90.5		43.5	67.1	21.0	
	V+6 j.	16	39.4		5.0	6.6	5.8	6
71	S	51	77.5		28.1	28.4	39.4	2
	V+3 j.	29	40.4			11.7	11.8	1
76	S	66	83.1	4.1	23.6	52.5	53.2	5
	V-3 j.	15	35.3	3.1	4.7	5.3	2.3	

Pour ces sérums, la valeur de R après la maladie est du même ordre que dans le cas général, c'est-à-dire comprise entre 0,10 et 0,20. Seule sa valeur initiale était plus faible; la chute du coefficient est donc moins considérable mais le phénomène reste bien le même.

Génisses 57, 64.

3°) Dans deux cas enfin (génisses 62 et 71) la chute de R a été un peu moins considérable mais toujours nette cependant.

Chez la génisse 62, le rapport d'extraction initial était normal (0,66). A l'époque V + 2 j (deux jours après la récolte de la vaccine) il était encore de 0,40, bien que l'animal fût très malade. Sa mort est survenue avant que les dosages de lipides ne fussent terminés; nous n'avons donc pu savoir si le coefficient R avait atteint sa valeur minima.

La génisse 71 a présenté un abaissement très net (de 0,51 à 0,29) mais moins considérable que celui des autres animaux.

Ainsi dans tous les cas où les lipides totaux furent déterminés, soit 17 au total (4 dans notre premier travail, 13 dans le second) le rapport d'extraction a considérablement diminué.

Le décompte des cas individuels peut se faire ainsi :

Valeur initiale de R	Supérieure à 0,66	13 cas
	Egale à 0,51	1 cas
	Voisine de 0,30	3 cas
Valeur finale de R	Inférieure à 0,18	14 cas
	Egale à 0,20	1 cas
	Egale à 0,29	1 cas
	Egale à 0,40	1 cas

Dans 4 autres cas, le rapport R ne fut pas déterminé, mais le sérum prélevé au cours de l'infection présentait le phénomène d'inextractibilité des lipides qui est corrélatif de la chute du rapport R.

Sur 21 animaux examinés, le phénomène a donc été observé 21 fois. La chute de R s'effectue suivant une loi qui est fonction à la fois de la résistance individuelle des animaux et de la virulence du produit inoculé, sans doute aussi de l'histoire pathologique antérieure du sujet, de son âge, de la température extérieure; peut-être même d'autres facteurs encore. On ne peut manquer en effet d'être frappé du parallélisme des chiffres individuels dans chacune des séries de trois animaux étudiés ensemble.

III

COMPARAISON DES LIPIDES EXTRAITS A FROID AUX LIPIDES TOTAUX

Les lipides extraits à froid en présence de petites quantités d'alcool ont-ils la même composition que les lipides totaux ?

Pour répondre à cette question, nous avons comparé le rapport $\frac{IT}{IT + AG}$ pour les lipides extraits à froid et pour les lipides totaux du même sérum.

Les résultats analytiques sont les suivants :

a) Lorsque les lipides extraits à froid représentent une proportion importante des lipides totaux, c'est-à-dire lorsqu'on est au voisinage du maximum d'extraction, ce rapport est notablement plus élevé pour les premiers que pour les seconds.

Il en va de même pour le rapport $\frac{Chol.}{IT + AG}$ qui évolue dans le même sens.

Si l'on établit maintenant le rapport $\frac{Chol.}{IT}$ pour les lipides extraits à froid et pour les lipides totaux, on constate qu'il est plus élevé dans le premier cas que dans le deuxième.

Ainsi à froid et au voisinage de l'extraction maximale on extrait beaucoup plus d'insaponifiable (et surtout de cholestérol) que d'acides gras. Au voisinage de cet optimum, l'éther additionné de faibles quantités d'alcool, réactif doux et très progressif, détruit principalement les liaisons de l'insaponifiable (et surtout du cholestérol) avec les protéides. Les liaisons de ceux-ci avec les acides gras semblent plus énergiques.

Il est intéressant de constater que c'est l'insaponifiable qui est le plus facilement libéré de ses attaches protéidiques : c'est sur lui que porte surtout le catabolisme des lipides au cours de la maladie.

b) Lorsque les lipides extraits à froid forment une faible partie des lipides totaux, le phénomène peut s'inverser : le

Numéro des génisses	Numéro de la saignée	Quantité d'alcool ajoutée à 25 cc. sérum + 25 cc. éther	Composition des lipides extraits						Composition des lipides totaux	
			Poids	IT	Chol	AG	IT + AG retrouvé	$\frac{IT}{IT+AG}$	$\frac{Chol}{IT+AG}$	$\frac{Chol}{IT+AG}$
58	1°	4 cc.	43.2	23.5	18.5	17.2	40.7	0.58	0.46	0.44
60	1°	4 cc.	66.4	35.0	33.0	27.8	62.8	0.56	0.52	0.43
61	1°	4 cc.	68.6	35.2		33.6	63.8	0.52		0.44
60	2°	4 cc.	51.6	26.0		26.8	52.8	0.49		0.38
61	2°	3 cc.	41.6	21.2		20.6	41.8	0.51		0.42
61	2°	4 cc.	41.9	20.1	19.6	20.1	39.7	0.50	0.49	0.42
61	3°	2+3+4+5+6	18.5	8.0		10.5	18.5	0.43		0.37
60	3°	4 cc.	11.3	4.7	3.8	8.0	12.7	0.37	0.30	0.39
60	3°	5 cc.	12.9	5.1		9.2	14.3	0.36		0.39
60	2°	6 cc.	21.5	7.5		14.1	21.6	0.34		0.38

rapport $\frac{IT}{IT+AG}$ des lipides extraits à froid est plus faible que celui des lipides totaux. Ceci se produit, d'une part, aux saignées faites chez l'animal malade, le rapport R étant très diminué, d'autre part loin du maximum d'extraction quand, après le plateau, la courbe s'infléchit vers l'axe des abscisses.

Dans le premier cas, le rapport $\frac{IT}{IT+AG}$ des lipides totaux a diminué comme nous l'avons déjà montré, mais celui des lipides extractibles à froid a baissé encore bien plus.

La composition des lipides extraits à froid comparée à celle des lipides totaux extraits par l'alcool et l'éther à chaud présente donc des variations fort importantes.

Lorsqu'une proportion notable des lipides est extractible à froid (rapport d'extraction élevé) la fraction insaponifiable et surtout le cholestérol prédominent. Au contraire, lorsque l'extractibilité est faible (rapport d'extraction peu élevé, lipides extraits pour des concentrations alcooliques très différentes de l'optimum) le pourcentage d'insaponifiable dans la fraction extraite diminue, peut devenir égal ou même inférieur à celui des lipides totaux.

VALEUR DU RAPPORT $\frac{\text{Chol}}{IT}$

Génisse	Numéro de la saignée	Lipides extraits à froid	Lipides totaux
58	1	0.78	0.75
60	1	0.94	0.80
60	3	0.80	0.76

EVOLUTION DES PROTEIDES

1. — PROTEIDES TOTAUX

Dans leur ensemble, les protéides totaux varient peu et d'une manière fort irrégulière, contrairement aux lipides dont la variation est toujours de même sens et à peu près de même grandeur.

Si l'on cherche à apprécier une variation globale en faisant la moyenne des chiffres obtenus à la première et à la deuxième saignée on trouve pour les huit génisses 57 à 64 :

Méthode de détermination	Pesée	Réfractométrie
Première saignée	72,5	76,6
Dernière saignée	73,7	77,7

La variation des protéides totaux est donc très faible et ne peut en aucun cas servir à déceler l'évolution de la maladie.

PROTEIDES TOTAUX (en gr. par litre de sérum)

Numéro des saignées	Pesée			Réfractométrie		
	1	2	3	1	2	3
Génisse 57	66.5	71.6		69.0	73.1	
Génisse 58	75.3	74.1	78.5	78.3	76.7	80.6
Génisse 59	69.0	71.1		72.4	74.2	
Génisse 60	76.2	75.0	66.4	79.8	78.9	66.2
Génisse 61	82.1	75.1	81.1	86.4	77.8	79.1
Génisse 62	60.6	72.4		67.9	78.7	
Génisse 63	75.1	78.8		79.3	85.6	
Génisse 64	75.2	70.1		79.6	72.2	
Moyennes	72.5	73.7		76.6	77.1	

II. — INDEX ALBUMINIQUE

Nous avons étudié pour cinq génisses les variations du rapport sérine/globuline. Pour les deux premières, les globulines et les albumines ont été déterminées sur 25 cc de sérum par la technique de MACHEBŒUF.

Pour les trois autres sérums, les dosages ont été faits par la méthode de HOWE.

On voit que ce rapport a constamment diminué et de façon très notable au cours de la maladie.

INDEX ALBUMINIQUE (rapport sérine/globuline)

Epoque de la saignée	S	V	V+8 j.
Génisse 57	0.69	0.33	
Génisse 58	0.57	0.48	0.32
Epoque de la saignée	S	V+4 j.	V+9 j.
Génisse 69	0.79	0.57	
Génisse 70	0.87		0.58
Génisse 71	0.81	0.67	

**EVOLUTION D'AUTRES CONSTANTES
CHIMIQUES ET PHYSIQUES**

En même temps que les lipides et les protéides, nous avons étudié les variations d'autres caractéristiques physiques et chimiques du sérum au cours de la maladie. Ces résultats se rapportent à l'urée, au chlore, au point cryoscopique.

I. — URÉE

L'urée a été dosée dans le sérum par la méthode au xanthidrol. Son taux chez l'animal sain oscille autour de

UREE (en gr. par litre de sérum)

N° des génisses	Saignée du 19-1	Saignée du 25-1	Saignée du 30-1
59	0,18	0,30	
60	0,18	0,56	0,37
61	0,16	0,27	0,56
	2-3	10-3	17-3
62	0,18	0,79	
63	0,24	0,53	
64	0,23		0,52
	4-4	13-4	
66	0,36	0,54	
67	0,32	0,55	
	19-5	28-5	31-5
68	0,45	0,37	
70	0,53		0,73
71	0,44	0,28	

0 gr. 20. Il augmente le plus souvent au cours de la maladie sans qu'il y ait corrélation entre l'état général et l'urémie.

Ainsi, dans la première série, c'est la génisse 59 qui est morte la première. Dans la deuxième, la génisse 64, qui avait le même taux d'urée que la génisse 63, a offert une bien plus grande résistance à la maladie, tandis que l'évolution de celle-ci a été la même que chez les génisses 62 et 63 dont l'azotémie a toujours été très inégale. Dans la cinquième série, il y a eu deux diminutions et une augmentation du taux de l'urée sanguine.

En résumé, au cours de la maladie, l'urée augmente généralement, mais on ne peut établir un rapport direct entre l'état général de l'animal et l'urémie.

II. — CHLORE

Le chlore a été dosé par la méthode de LAUDAT. Son taux moyen, exprimé en chlorure de sodium, est 5 gr. 50.

Chez l'animal malade, les chiffres restent sensiblement les mêmes. En moyenne, il y a une légère diminution du chlore. Mais cette différence est très faible et peu significative. En effet, alors que le taux de l'urée est sensiblement le même dans le plasma et les hématies, celui des chlorures est bien plus élevé dans le plasma. Souvent, le sang des animaux malades subit spontanément une hémolyse partielle, ce qui peut diminuer légèrement le taux des chlorures sériques.

CHLORE (en gr. de Na Cl par litre de sérum)

POINT CRYOSCOPIQUE

Saignée du	8 déc.	15 déc.	23 décembre	8 déc.	15 déc.	23 déc.
Génisse 56	5 gr. 85			0°55		
— 57	5 gr. 62	6 gr. 14		0°555	0°54	
— 58	5 gr. 62	5 gr. 56	5 gr. 38	0°54	0°545	0°53
Saignée du	19 janv.	25 janv.	27 janvier 30	19 janv.	25 janv.	30 janv.
Génisse 59	5 gr. 73	5 gr. 27		0°53	0°57	
— 60	5 gr. 79	5 gr. 48	5 gr. 38	0°53	0°55	0°545
— 61	5 gr. 85	5 gr. 85	5 gr. 48	0°535	0°54	0°58
Saignée du	2 mars	10 mars		2 mars	10 mars	
Génisse 62	5 gr. 27	5 gr. 96		0°545	0°57	
— 63	5 gr. 27	5 gr. 21		0°54	0°525	
— 64	5 gr. 44			0°555	0°585	

III. — POINT CRYOSCOPIQUE

L'abaissement du point de congélation oscille autour de 0°54. Il y a en moyenne une légère augmentation de celui-ci, la diminution des chlorures étant compensée et au delà par l'augmentation de l'urée.

Dans l'ensemble, ces variations sont de faible amplitude et la pression osmotique du sérum reste sensiblement constante.

CONCLUSIONS

Il résulte de cet ensemble de recherches entrepris sur les modifications que subit le sérum sanguin chez la génisse au cours de la maladie vaccinale qu'on ne peut attribuer aucune valeur pronostique aux déterminations du point cryoscopique, de l'urée, du chlore et des protéides totaux.

L'abaissement de l'index albuminique est fort constant et d'intensité notable mais trop peu spécifique. Nous avons rappelé qu'il se produit au cours de la plupart des maladies.

Tout l'intérêt de cette étude se concentre sur les lipides :

Quantitativement, ils diminuent à peu près de moitié.

C'est la fraction insaponifiable qui disparaît le plus vite du sérum au cours de la maladie. Il est à remarquer aussi que les lipides les plus labiles (lipides extraits à froid) sont plus riches en insaponifiable que les lipides totaux.

Mais les résultats les plus intéressants de cette étude découlent de nos recherches sur l'état des lipides :

Le rapport d'extraction baisse et le plus souvent dans des proportions considérables au cours de la maladie vaccinale. La diminution de l'extractibilité est un phénomène d'une absolue généralité.

Les mêmes catégories de lipides peuvent donc contracter avec les protéides des liaisons d'intensité extrêmement variable.

L'étude d'autres maladies nous montrera que c'est ce changement de l'état des lipides (rapport d'extraction abaissé) et non le sens de la variation de leur taux qui est la vraie caractéristique des états pathologiques.

II

LE SYSTÈME LIPOPROTEÏDIQUE DU SÉRUM AU COURS DE L'INFECTION VACCINALE LOCALISÉE

Nous avons longuement étudié l'évolution du système lipoprotéïdique du sérum chez la génisse après inoculation de quantités massives de virus de la vaccine.

Dans un certain nombre de cas, nous l'avons vu, la réaction vaccinale se produit sans qu'il y ait modification appréciable de la stabilité des lipides. Ce n'est qu'au cours de l'infection secondaire produite par les germes pyogènes se développant sur la peau lésée qu'apparaît le phénomène que nous avons décrit : la chute brusque du rapport d'extraction. Ce sont les toxines secrétées par ces microbes qui provoquent la mort de l'animal.

Le but de l'étude précédente n'était donc pas de décrire une réaction spécifique au sens microbiologique du mot, mais de chercher à connaître le comportement du système lipoprotéïdique du sérum à une atteinte sévère de l'organisme.

Nous avons tout de même tenté de séparer, dans la mesure du possible, les deux actions : évolution du virus vaccinal dans l'organisme, développement des germes d'envahissement secondaire, pour étudier les réactions correspondantes du sérum à chacune d'elles.

Ces recherches portent sur la génisse et le lapin et ont été conduites de la façon suivante :

GENISSE

La génisse 80 a été inoculée par le procédé déjà décrit, mais sur une surface cutanée très réduite. Son état général n'a cessé d'être excellent. L'animal a bien supporté la réaction locale et son bilan lipidique reflète fidèlement l'évolution de celle-ci.

Lipides totaux : L'extrait lipoïdique total a subi une diminution assez faible au 5^e jour de la maladie (jour de la récolte de la pulpe vaccinale) mais qui

s'accroît jusqu'au 13^e jour pour se relever lentement à partir du 21^e jour, revenir à peu près à la normale au 41^e jour et la dépasser nettement au 59^e jour.

Rapport d'extraction : Pas de changement au 5^e jour de la maladie puis chute légère qui coïncide avec le minimum de lipides totaux, et retour à la valeur première à l'époque où le taux des lipides totaux remonte pour atteindre et dépasser sa valeur première.

N ^o Saignée	Nombre de jours après l'inoculation	Lipides extractibles à froid				L.T.	R
		3 cc 5	4 cc	4 cc 5	5 cc		
1	0	55.2	57.2	58.7	62.1	78.8	0.78
2	5			54.6	54.4	69.3	0.78
3	13		35.3	36.1	36.1	51.3	0.70
4	21		38.8	58.1	38.2	54.6	0.71
5	41		55.5	55.2		71.5	0.78
6	59		81.1	82.8	83.8	106.0	0.79

Ainsi, la maladie vaccinale évoluant normalement et l'infection secondaire due aux germes pyogènes étant peu importante, l'état général de l'animal reste bon. Il y a diminution des lipides sériques, mais le rapport d'extraction varie très peu.

LAPIN

TRAVAUX DE M. COPPO ET DE SES COLLABORATEURS

Nos travaux sur le système lipoprotéidique du sérum au cours des états pathologiques ont incité certains auteurs à entreprendre des recherches dans ce domaine tout à fait nouveau.

Technique. — COPPO, TRAVIA et GUALANDI (1936) ont d'abord vérifié la technique à laquelle nous nous sommes arrêtés et qui leur a donné d'excellents résultats.

Pour pouvoir l'appliquer à l'étude de petites quantités de sérum (4 cc au lieu de 25 cc), ils lui ont fait subir un certain nombre de modifications [6].

Ils ont augmenté la quantité d'éther par rapport à celle du sérum. Cela est tout à fait admissible.

Le temps de contact, fixé par nous à 15 heures, a été porté à 36 et 48 heures. Ceci ne nous paraît guère recommandable ; l'alcool, même à de faibles concentrations, peut, par action prolongée, provoquer un commencement de dénaturation du sérum.

Mais l'erreur la plus grave commise par ces auteurs est d'ajouter l'alcool au sérum avant l'éther. L'alcool absolu qu'ils emploient, arrivant au contact du sérum, produit une dénaturation locale qui, dépendant de beaucoup de facteurs, l'agitation en particulier, n'est pas comparable à elle-même d'une expérience à l'autre. Au contraire, l'alcool, ajouté à l'éther, s'y dilue avant d'atteindre les protéides. Sa concentration dans le sérum n'est jamais supérieure à celle à laquelle on désire le faire agir. Il ne peut donc y produire de dissociation irréversible des cénapses lipoprotéïdiques.

Résultats. — Utilisant cette technique, COPPO et MAGGRASSI déterminent (1937) les lipides extraits à froid par l'éther alcoolisé du sérum de lapins sains et inoculés par voie intradermique avec du virus vaccinal testiculaire [7]. Les lipides totaux n'ont pas été déterminés.

Confrontant les chiffres ainsi obtenus, les auteurs concluent que les lipides extraits à froid augmentent au cours de l'infection.

Critique. — De telles conclusions ne peuvent être acceptées pour les raisons suivantes :

a) La méthode employée par COPPO et ses collaborateurs, et dont nous venons de faire la critique, ne détermine pas les lipides extraits à froid, tels que MACHEBŒUF et SANDOR d'une part, et nous, d'autre part, les avons définis.

b) On ne peut savoir ce que représentent les lipides extraits à froid par rapport aux lipides totaux, puisque ceux-ci n'ont pas été déterminés. Cette proportion définit précisément un coefficient d'extractibilité (notre « rapport d'extraction ») qui seul présente de l'intérêt alors que la lipidémie est très irrégulière.

c) Ce sont des animaux différents qui ont servi à déterminer les lipides extraits à froid dans l'état de santé et de

maladie. La lipidémie est trop variable d'un animal à l'autre pour qu'on puisse établir des conclusions sur de telles mesures, surtout si l'on n'a pas rapporté les résultats trouvés aux lipides totaux.

TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons donc repris cette étude en expérimentant sur le lapin avant et après inoculation intradermique de virus vaccinal.

Nos résultats sont établis sur trois animaux.

Technique. — A de très gros lapins on peut prélever par ponction cardiaque 20 à 25 cc de sang. Ces saignées, faites dans les conditions déjà énoncées, sont bien supportées.

En quinze à vingt jours, l'animal a récupéré les éléments de son sang ; sa formule sanguine est redevenue normale. On attend encore quelques jours et on inocule le virus par voie intradermique. Dans le premier cas rapporté ici, ce virus était constitué par le produit du broyage en eau physiologique stérile de testicule de lapin infecté, dans les deux autres cas par une émulsion de cerveau virulent; les résultats sont d'ailleurs tout à fait comparables.

Sept jours après l'inoculation, l'animal était à nouveau saigné dans les mêmes conditions.

Lipides extraits à froid : Pour les petites quantités de sérum utilisées nous avons employé, comme les auteurs italiens, une quantité d'éther supérieure à celle de sérum.

Pratiquement, dans des ampoules à décanter, on introduit 6 cc de sérum, 12 cc d'éther et des volumes d'alcool voisins de l'optimum d'extraction. La phase étherée est séparée et les lipides sont dosés suivant la technique habituelle.

Lipides totaux : Les quantités de sérum étant limitées, on détermine les lipides non extraits par le mélange alcool-éther de la façon suivante : le mélange de sérum partiellement délipidé contenant de l'alcool et de l'éther est porté au bain-marie pour chasser ce solvant et additionné d'un excès d'alcool. Après quelques minutes d'ébullition, le coagulum obtenu est soumis à la lixiviation par l'alcool et par l'éther dans

l'appareil à extraction continue de KUMAGAWA suivant la technique déjà décrite.

L'extrait lipoidique total (L. T.) se compose des substances lipoidiques ainsi extraites et de celles qui se sont dissoutes dans le mélange alcool-éthéré à froid (L. F.). Le rapport d'extraction R est égal à $\frac{L.F.}{L.T.}$.

Résultats. — Le résultats sont exprimés en gr. par litre de sérum.

	LAPIN I			LAPIN II			LAPIN III		
	L.F.	L.T.	R	L.F.	L.T.	R	L.F.	L.T.	R
1 ^{re} Saignée .	1.34	4.40	0.30	1.22	4.31	0.29	0.98	2.78	0.35
2 ^e Saignée ...	0.61	1.55	0.38	1.05	2.86	0.36	0.62	1.16	0.37

On voit que les lipides totaux diminuent *grosso modo* dans la proportion de 2 à 1. Les lipides que l'on peut extraire à froid par l'éther additionné de petites quantités d'alcool varient dans le même sens et à peu près dans la même proportion. La variation du rapport d'extraction est en effet insignifiante. La légère augmentation que traduisent des chiffres expérimentaux établis sur de faibles quantités de sérum et avec une certaine indétermination sur la valeur exacte du plateau d'extraction, ne doit pas être retenue ; elle est dans les limites des erreurs expérimentales possibles.

CONCLUSIONS

Au cours de la maladie vaccinale, les lipides totaux du sérum diminuent, aussi bien chez le lapin que chez la génisse. Ce phénomène ne paraît pas dépendre de la gravité de la maladie.

Chez la génisse 80, qui a réagi faiblement, les lipides totaux ont diminué dans le rapport de 1 à 0.64. Or, pour les génisses soumises à l'infection massive, nous avons trouvé comme chiffre correspondant moyen 0.56 avec des valeurs extrêmes de 0.84 et 0.45.

Les variations du rapport d'extraction, par contre, reflètent la gravité de la maladie : chute à peine sensible de R pour la génisse 80 (de 0.78 à 0.70) très importante au contraire pour les génisses précédemment étudiées (de 0.64 à 0.16 en moyenne).

On peut donc penser que *la diminution des lipides totaux est provoquée par la maladie vaccinale, tandis que l'accroissement de stabilité du système lipoprotéidique du sérum est dû à la réaction de défense de l'organisme contre les microbes pyogènes.*

L'évolution du seul virus vaccinal chez le lapin confirme cette conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — VLÈS (F.) et DE COULON : Recherches sur les propriétés physico-chimiques des tissus en relation avec l'état normal ou pathologique.
Voir : *Arch. Phys. biol.*, depuis 1924.
- 2 — LECOMTE DU NOÛY (P.) : Equilibres superficiels des solutions colloïdales.
Paris, Masson, 1 vol. (1929).
- 3 — BLANC (G.) et DELAGE (B.) : Quelques données physico-chimiques sur le comportement des virus typhiques vis-à-vis de la bile.
C. R. Soc. Biol., 1934, 115, 1471.
- 4 — DELAGE (B.) : Extractibilité des lipides sériques par l'éther en présence d'alcool à froid en relation avec l'état de santé ou de maladie.
Bull. Soc. Chim. biol., 1935, 17, 938.
- 5 — DELAGE (B.) : Recherches sur le sérum sanguin chez la génisse au cours de la maladie vaccinale.
Bull. Soc. Chim. biol., 1937, 19, 1407.
- 6 — COPPO (M.), TRAVIA et GUALANDI : Osservazioni di tecnica e ricerche preliminari per lo studio dei complessi lipoproteici del siero.
Diagnostica et tecnica di laboratorio, 1936, 7, n° 9.
- 7 — COPPO (M.) et MAGRASSI : Studi sui complessi lipoproteici del siero : loro modificazioni nello « Stato di infezione » (Infezioni da ultravirus).
Annali d'Igiene, 1937.

CHAPITRE III

ANÉMIE INFECTIEUSE ET TRYPANOSOMIASES

L'étude que nous avons entreprise sur le système lipoprotéidique du sérum au cours des états pathologiques porte également sur deux maladies des équidés qui ont pour symptôme commun une anémie plus ou moins prononcée. L'agent de l'une d'elles (anémie infectieuse ou typhoanémie) est un virus filtrable, celui de l'autre (dourine, trypanosomiose du cheval) est un protozoaire flagellé appartenant au genre *Trypanosoma*.

RECHERCHES ANTERIEURES

Les recherches sur la séméiologie du sang au cours de ces affections sont très nombreuses [1]. Un grand nombre sont relatives à l'index albuminique et surtout à l'allure de la sédimentation des hématies au sein du plasma fluoré. Le système lipoprotéidique du sérum des animaux malades n'a guère attiré l'attention des chercheurs.

GORET et SANDOR [2], puis GORET, SANDOR et DOMERCQ [3] ont étudié à ce point de vue un certain nombre de chevaux anémiques. Ils notent assez souvent une diminution de l'extractibilité des lipides sériques avec déplacement du maximum d'extraction tantôt vers les teneurs en alcool élevées, tantôt vers les concentrations alcooliques inférieures à celles qui correspondent pour les chevaux normaux à l'optimum.

RECHERCHES PERSONNELLES

Nous avons recueilli depuis plus de cinq ans un certain nombre d'observations dont nous présentons ici un exposé d'ensemble [4].

OBSERVATIONS SUR LES CAS EXAMINÉS

Les poids de lipides extractibles à froid, exprimés en mgr., se rapportent toujours à 25 cc de sérum + 2⁵ cc d'éther + quantités d'alcool indiquées.

Les lipides totaux sont aussi exprimés en mgr. pour 25 cc de sérum et représentés par L.T. : — R. est le rapport d'extraction.

ANEMIE INFECTIEUSE.

Sujet N° 1. — Cheval DOUM. Laboratoire de l'Élevage. Prélevé 1 litre de sang le 23 Janvier 1933.

Animal maigre, efflanqué, extrémités gonflées, muqueuses pâles. Hypohémoglobinémie très forte. Le sang est peu coloré, le caillot se forme mal.

Chlore (en NaCl) : 5 gr. 91 par litre.

Volume ajouté	0 cc	2 cc	2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc	8 cc
Alc. éthylique	3.5	4.5	7.0	6.5	6.5	12.2	18.9	14.4	
Alc. méthylique ...				4.4	5.4	12.1	21.2	19.5	15.4

Faible extractibilité (par rapport aux chiffres normaux). Déplacement du maximum d'extraction vers les abscisses croissantes.

Protéides totaux : 84 gr. 2 par litre.

Sujet N° 2. — Cheval typhoanémique. Laboratoire de l'Élevage. Sang prélevé le 2 Mai 1933.

Alcool éthylique	0 cc	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc
mgr. de lipides	4.0	4.5	5.6	6.4	6.3	5.5

L.T. = 103,0

R = 0,06

Faible extractibilité : Rapport d'extraction bas.

Protéides totaux 76 gr. par litre.

Globulines 60. gr. par litre. Albumines 16 gr. par litre.

Index albuminique bas (S/G = 0.27).

Sujet N° 3. — Ane de l'armée (Aïn-Bordja) Saigné au moment d'un accès thermique le 20 Juillet 1934.

Alcool éthylique ...	2 cc	2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc	8 cc
mgr. de lipides	5.5	6.2	9.5	83.8	83.1	25.3	30.0	25.0

L.T. = 122,0

R = 0,69

Extractibilité normale ; Rapport d'extraction normal.
Protéides totaux 75 gr. 8 par litre.

Sujet N° 4. — Mulet URTICAIRE. Inoculé avec un broyage de rate provenant du sujet n° 3. Pas de poussées thermiques. Toutes les réactions de l'anémie infectieuse sont négatives. Saigné le 23 Juillet.

Alcool méthylique	0 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc
mgr. de lipides	2.2	41.2	43.3	46.1	20.2	14.4	18.2

L.T. = 49,5

R = 0,94

Sujet N° 5. — Cheval de l'armée (Aïn-Bordja). Saigné le 28 Juillet 1934.
Enorme caillot blanc. Sédimentation très rapide. Hypohémoglobinémie très forte. Sérum laiteux, fluorescent.

Alcool éthylique	0 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc	8 cc
mgr. de lipides	45.6	388.0	387.4	374.8	371.4	315.4	111.4

L.T. = 392,0

R = 0,99

Hyperlipémie très intense (15 gr. 68 de lipides par litre). Rapport d'extraction anormalement élevé. Abscisse du maximum d'extraction normale. Plateau très large.

Sujet N° 6. — Cheval de l'armée (Aïn-Bordja). Saigné au cours d'un accès thermique (T = 40°,4). Sérum assez fortement hémolysé.

Alcool méthylique	0 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	7 cc
mgr. de lipides	5.2	8.0	84.7	102.0	82.1	90.0

L.T. = 131,0

R = 0,79

TRYPANOSOMIASES.

Sujet N° 7. — Cheval atteint de trypanosomiase. Laboratoire de l'Elevage. Saigné le 12 Juillet 1933.

Alcool méthylique	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc
mgr. de lipides	4.9	5.1	5.4	7.8	10.9	18.9

Forte diminution de l'extractibilité avec déplacement du maximum vers les abscisses croissantes.

Sujet N° 8. — Inoculé le 6 juillet, réagit le 12.

Traité par le 914 le 17-18 juillet.

Pas de poussées thermiques mais symptômes cliniques faisant penser à la dourine.

Saigné le 3 octobre.

Alcool éthylique	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc
mgr. de lipides	2.0	5.6	19.4	24.9	26.9	26.9

Sujet N° 9. — Inoculé le 3 juillet 1933, réagit le 11.

Traité par le 914 le 17-18 juillet.

Pas de poussées thermiques ni de signes cliniques jusqu'à la saignée qui est faite le 3 octobre.

Alcool éthylique	2 cc	4 cc	6 cc
mgr. de lipides	3.0	35.5	10.3

Le sujet N° 8, traité, présente une diminution moins sensible de l'extractibilité mais déplacement du maximum d'extraction vers les abscisses croissantes.

Le sujet N° 9, guéri cliniquement, a une courbe d'extraction qui se rapproche assez d'une courbe normale.

Sujet N° 10. — Trypanosomiase. Cheval de l'armée, saigné le 19 Mai 1934. Sérum exsudant très lentement. Enorme caillot blanc.

$$L.T. = 52,8$$

$$R = 0,66$$

Plateau très large. Courbe normale. Rapport d'extraction normal. Protéides totaux 74 gr. 5 par litre.

Alcool éthylique	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	5 cc
mgr. de lipides	4.9	35.0	35.0	31.8	34.7

ANEMIE INFECTIEUSE EXPERIMENTALE.

Sujet N° 11. — Ane 35.

1^{re} saignée (300 cc environ).

1^{re} inoculation intraveineuse de virus d'anémie infectieuse (10 j. après la saignée).

L'animal fait une **maladie inapparente**.

2^e inoculation d'épreuve (25 j. après la 1^{re}) par voie intraveineuse d'un virus très actif. Pas de réaction.

2^e saignée 18 j. après l'inoculation d'épreuve (300 cc environ).

Alcool éthylique	2 cc 5	3 cc	4 cc	L.T.	R.
1 ^{re} saignée	32.8	36.5	20.8	68.2	0.54
2 ^e saignée	15.2	16.7	14.9	67.3	0.27

Sujet N° 12. — Ane 36.

1^{re} saignée (300 cc environ).

Inoculation intraveineuse du virus d'anémie infectieuse (10 j. après la saignée).

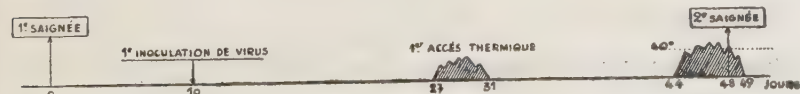
L'animal présente 2 accès thermiques, le dernier en plateau à 40° pendant 4 jours.

2^e saignée : le 3^e jour du 2^e accès, soit 38 jours après l'inoculation.

Alcool éthylique	2 cc 5	3 cc	4 cc	L.T.	R.
1 ^{re} saignée	38.6	40.2	33.9	53.6	0.71
2 ^e saignée	8.7	8.6	7.8	47.0	0.18



ANE 35



ANE 36

EXAMEN CRITIQUE DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les résultats n'offrent pas le même intérêt que ceux auxquels nous a conduit l'étude de la maladie vaccinale : sauf dans deux cas, nous n'avons pu comparer le sérum des animaux sains et malades. De plus, l'infection par le virus typhoanémique est moins sûre que l'infection par le virus vaccinal. L'évolution de la maladie est plus lente, plus irrégulière, souvent atypique.

Aussi, l'examen des cas exige-t-il une critique beaucoup plus attentive. Nos observations proviennent de trois sources :

1° Un certain nombre de sérums proviennent d'animaux inoculés avec un virus authentique, étudié depuis plusieurs années au Maroc par VELU et ZOTTNER.

Observations 1, 2, 11, 12.

Les animaux atteints de trypanosomiase, dont les observations sont rapportées ici, ont été étudiés par les mêmes auteurs.

Les caractéristiques de tous ces sérums sont celles que présentent les bovidés inoculés avec le virus vaccinal :

Extractibilité des lipides sériques très diminuée (par rapport aux chiffres moyens normaux).

Rapport d'extraction bas.

Déplacement du maximum de la courbe d'extraction vers les abscisses croissantes.

2° Un autre groupe comprend des équidés de l'armée présentant des signes cliniques faisant penser à l'anémie infectieuse.

Observations 3, 4, 5, 6, 10.

Pour tous ces animaux l'extractibilité des lipides sériques est normale.

Que doit-on penser de ces résultats ?

Tous les auteurs qui se sont occupés d'anémie infectieuse savent combien le diagnostic de cette affection est difficile. Le seul critère à peu près certain de typhoanémie est l'inoculation à un autre équidé d'un fragment d'organe ou de tissu de l'animal suspect.

C'est précisément le cas du sujet n° 3.

L'examen de son sérum donna pour le rapport d'extraction une valeur normale. Quelques jours après cette saignée, l'animal mourait au cours d'un accès thermique qui fit porter le diagnostic d'anémie infectieuse.

Or, un fragment de sa rate fut broyé et inoculé à un mulet (sujet n° 4) qui ne présenta aucune réaction clinique d'anémie infectieuse et dont le sérum garda des caractéristiques d'extractibilité normales. L'animal n° 3 n'était donc pas anémique.

Le sujet n° 5 représente un cas tout à fait anormal. Il avait une hyperlipidémie considérable (L.T. = 15 gr. 68) avec un rapport d'extraction très élevé (pratiquement égal à l'unité).

Les chevaux n° 6 (anémie infectieuse ?) et 10 (dou-rine ?) avaient des constantes d'extractibilité normales.

3° Les sujets 11 et 12 présentent un intérêt plus considérable. Ils ont servi à une étude expérimentale de l'anémie infectieuse. Leur sang a été étudié avant et après inoculation de sérum virulent.

L'un d'eux (âne 35) a fait une maladie inapparente (pas de poussées thermiques).

La lipidémie n'a pas varié.

Le rapport d'extraction a passé de 0.54 à 0.27.

L'autre (âne 36) a servi de témoin. Inoculé dans les mêmes conditions que l'âne 35, il a présenté tous les signes cliniques de l'anémie infectieuse.

La lipidémie a diminué.

Le rapport d'extraction a subi une chute considérable (de 0.71 à 0.18), analogue à celles que la maladie vaccinale permet d'observer chez la génisse.

CONCLUSIONS :

Bon nombre de résultats sont très nets : il y a concordance entre les signes cliniques d'anémie infectieuse ou de dourine et les modifications de la courbe d'extraction qui traduisent l'« état de maladie ».

Chez certains animaux, le diagnostic d'anémie infectieuse a été porté sans qu'il y ait eu diminution du rapport d'extraction. Dans certains cas, ce diagnostic a été infirmé par l'épreuve d'inoculation à un autre équidé. Dans d'autres, il a pu y avoir présence de virus dans l'organisme avec rapport d'extraction normal. Ces discordances sont dues au fait que l'anémie infectieuse et les trypanosomiasés sont des maladies à évolution assez lente, irrégulière, d'allure chronique, sans symptômes bien nets. Le diagnostic est difficile, il n'y a pas d'immunité et seuls réagissent les équidés. animaux dont le prix élevé ne permet guère une expérimentation en série.

Dans l'ensemble, les caractéristiques du sérum des équidés au cours de l'anémie infectieuse et de la dourine sont les mêmes que pour les bovidés inoculés avec des doses massives de virus vaccinal :

- Diminution des lipides totaux.
- Déplacement du maximum d'extractibilité des lipides vers les concentrations alcooliques élevées.
- Chute du rapport d'extraction.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — LAMARRE (L.) : L'anémie infectieuse du cheval.
Paris, Vigot, 1 vol. (1933).
2. — GORET (P.) et SANDOR : Etude du système lipoprotéidique du sérum des chevaux atteints d'anémie infectieuse.
Bull. Ac. Vét. de France, 1934, 7, 383.
3. — GORET (P.), SANDOR et DOMERG : Etude comparative du système lipoprotéidique du sérum des chevaux atteints d'anémie infectieuse, des chevaux normaux, des chevaux fiévreux et hyperimmunisés.
Bull. Ac. Vét. de France, 1935, 8, 517.
4. — DELACE (B.). Le système lipoprotéidique du sérum au cours de l'anémie infectieuse et de la dourine chez les équidés.
C. R. Soc. Biol., 1938, 128, 935.

CHAPITRE IV

NÉPHRITE EXPÉRIMENTALE URANIQUE

La maladie vaccinale, nous l'avons vu, s'accompagne chez la génisse d'une diminution notable des lipides totaux. Dans l'inoculation massive de virus, on observe en outre un abaissement très considérable du rapport d'extraction. Ce phénomène semble être dû à l'envahissement secondaire par les germes pyogènes ; il est peu accentué dans l'infection localisée.

Il nous a paru intéressant d'étudier le comportement du système lipoprotéidique du sérum dans une maladie pouvant entraîner une hyperlipidémie ; on sait qu'un tel syndrome accompagne souvent la néphrite chez l'homme — il y a d'ailleurs des exceptions. Diverses substances provoquent chez l'animal une néphrite dont l'allure peut être réglée dans une certaine mesure par les doses injectées. Les chiffres que nous avons trouvés dans la littérature se rapportent tous à l'albumine urinaire et à l'urée sanguine.

Parmi les substances néphritogènes, les plus employées sont l'hydroxyde de bismuth (DALCHI et VILLEJEAN, LEVADITI ; RATHERY et RICHARD ; PASTEUR-VALLERY-RADOT [1]) et le nitrate d'urane (BARTFELD [2] ; GARNIER, SCHULMANN et MAREK [3] ; MAURIAC et SERVANTIE [4]) en injection sous-cutanée.

L. MARTIN et A. PETTIT [5] ont même établi que l'ingestion de poudre de lait provoque chez le lapin et chez le rat une albuminurie et une azotémie dont les animaux meu-

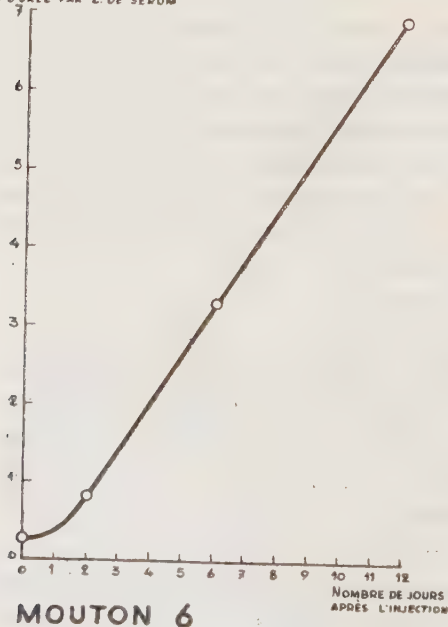
rent toujours. PASTEUR-VALLERY-RADOT [6] a confirmé ces faits et a montré que si l'albuminurie, la cylindrurie et la glycosurie étaient des caractères inconstants et passagers, l'azotémie se manifestait toujours et que l'animal mourait dans un délai compris entre quelques semaines et quelques mois, avec des taux d'urée sanguine supérieurs à 1 gr. par litre.

Pour obtenir une azotémie intense et rapide et ne pas introduire dans l'organisme de protéides étrangers, nous avons adopté le nitrate d'urane.

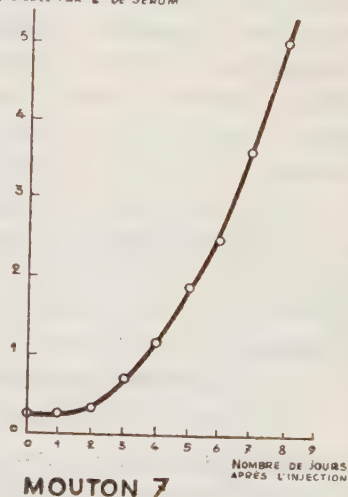
Les recherches nécessitant le prélèvement de quantités un peu importantes de sang ne sont guère praticables que sur des animaux assez gros pour le supporter sans que l'état physico-chimique de leur sang en subisse des répercussions sensibles : nous avons choisi le mouton.

L'injection sous-cutanée de 1 mgr. de nitrate d'urane par kgr. d'animal provoque chez le lapin l'albuminurie et l'azotémie dans les 24 heures (GARNIER et MAREK [7]). Nous

Gr. d'urée par l. de sérum



Gr. d'urée par l. de sérum



INFLUENCE DU NITRATE D'URANE SUR L'AZOTEMIE CHEZ LE MOUTON
(les taux d'urée sont exprimés en gr. par l. de sérum)

Quant. injectée		1				2	3		10						20					
Nb. de j. après l'injection.		0	1	3	10	1	2	3	2	3	4	5	6	7	8	2	3	5	6	12
N° du mouton	1	0.23	0.23	0.29	0.67											3.03		6.70		
	2	0.18	0.20		0.30															
	3	0.37					0.39													
	4	0.33						0.47	0.65											
	5	0.49							1.39	2.36										
	6	0.25														0.80			3.29	6.95
	7	0.21							0.33	0.70	1.17	1.88	2.48	3.60	5.01					

avons constaté que ce dosage était nettement insuffisant chez le mouton [8].

Il faut employer au moins 3 mgr./kgr. d'animal et attendre plus longtemps pour observer une variation appréciable de l'azotémie.

Voici un tableau malheureusement incomplet, étant donné le petit nombre d'animaux utilisés, qui indique comment varie le taux de l'urée sanguine en fonction de la quantité de nitrate d'urane (exprimée en mgr. par kgr. d'animal) et du nombre de jours après l'injection.

Les animaux ont toujours été saignés dans les conditions déjà énoncées (*).

EVOLUTION DES LIPIDES AU COURS DE LA MALADIE

Nous avons étudié les lipides totaux et le rapport d'extraction avant l'injection uranique et au cours de la maladie.

I. — VARIATION DU TAUX DES LIPIDES

Il est très irrégulier et dépend à la fois des cas individuels et sans doute de l'intensité et de la rapidité d'évolution de la maladie.

Sur sept observations, il y a eu deux fois (moutons 3 et 6) hyperlipidémie assez forte (dans le rapport moyen de 1 à 2,25) ; deux fois (moutons 4 et 7) hypolipidémie moins accentuée (dans le rapport moyen de 1 à 0,65) ; dans trois cas (moutons 1, 2 et 5) la variation était insignifiante mais l'un deux (mouton 2) se rapporte à un animal qui avait reçu une dose trop faible de nitrate d'urane.

II. — RAPPORT D'EXTRACTION

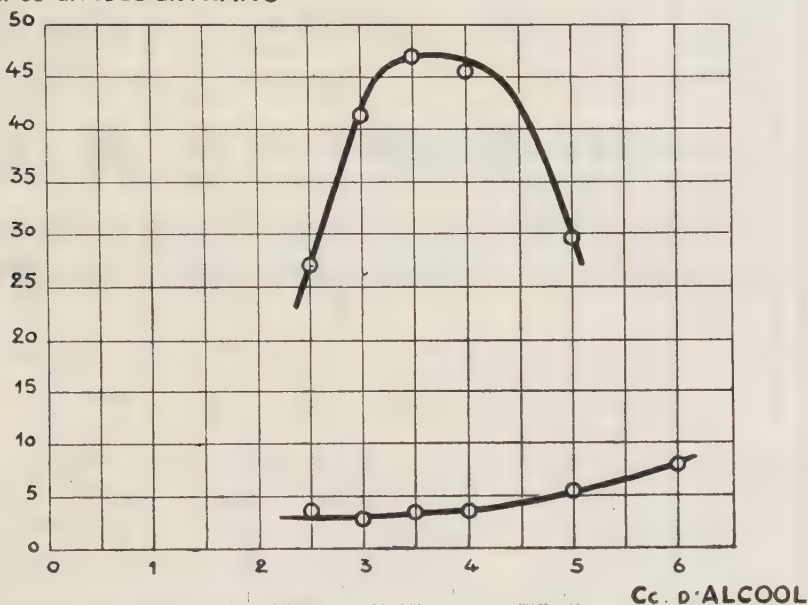
Au cours de la maladie le rapport d'extraction évolue généralement vers la diminution.

Sur sept observations, il y a eu quatre fois (moutons 1, 3, 5, 7) diminution très considérable de ce rapport (en

(*) Voir 1^{re} partie, chap. 1.

moyenne de 0.64 à 0.13). Deux fois il est resté sensiblement inchangé (de 0,22 à 0,24 et de 0.42 à 0.45). On remarquera qu'il s'agit d'animaux ayant une valeur initiale faible de ce paramètre. Le mouton N° 4 (valeur initiale 0.22) avait d'ail-

MGR DE LIPIDES EXTRAITS



MOUTON 7

COURBE SUPÉRIEURE : AVANT L'INJECTION DE NITRATE D'URANE
(10mgr. PAR Kgr.)
COURBE INFÉRIEURE : 8 JOURS APRÈS L'INJECTION

leurs été inoculé quelque temps auparavant avec du virus claveleux et avait eu une réaction assez forte.

Le septième cas se rapporte au mouton N° 2 qui a reçu une dose trop faible ; chez cet animal l'urée, les lipides totaux et le rapport d'extraction sont restés sensiblement constants.

III. — PHOSPHORE

Nous avons étudié chez le mouton N° 7 le phosphore total et le phosphore lipoidique.

Moutons	Nb. de jours apres l'injection	R. x100	L.T.	Lipides extraits à poids pour							25 cc. de sérum ; + 25 cc. d'éther ; + N. cc. d'alcool.		
				1,5 cc.	2 cc.	2,5 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.			
1	— 3 j. 10 j.	67 51 21	35,4 26,4 31,1	4,8	23,6 3,2 6,5	22,8	22,5 13,6 6,6	7,5 8,0 7,3	6,4 13,4				
2	— 1 j. 10 j.	77 74 75	36,6 30,9 34,2		7,0 4,4 6,1		10,1 14,2 22,6	28,1 22,8 25,6	14,3 11,2 24,7		12,8 10,4 13,0		
3	— 1 j. 2 ^e inj. 2 j. 5 j.	59 46 30 6	51,0 53,3 82,4 103,2	3,6 3,8 5,0	4,1 3,4 2,6	20,1 3,9 4,8	29,1 13,4 6,2 5,4	29,3 24,3 24,7 6,6	14,6 8,4		8,3 8,6 12,5		
4	— 3 j.	22 24	59,8 46,2		4,9	7,3 5,8	7,2 5,6	10,2 9,0	10,1 7,2		12,8 11,5		
5	— 3 j.	62 16	45,5 46,4		5,4	9,5 3,7	13,6 4,7	28,1 5,6	10,5 7,2		9,5 7,1		
6	— 6 j.	42 45	33,0 85,6	2,8	4,5 4,5	6,7	12,5 34,1	13,8 38,3	11,1 32,8		9,9 17,5		
7	— 8 j.	67 8	69,8 41,6			26,8 3,5	41,2 2,7	46,8 3,4	45,3 3,4		29,7 7,8		

Les résultats sont exprimés en mgr. par litre de sérum.

	P total	P lipoid.	$\frac{\text{P lipoid.}}{\text{P total}}$
1 ^{re} saignée	73	24	0,33
2 ^{me} saignée	83	20	0,24

Au cours de la maladie le P lipoidique a diminué mais moins que les lipides totaux. Au contraire le P total a augmenté. Il en résulte que le rapport $\frac{\text{P lipoidique}}{\text{P total}}$ a subi une diminution de 28 pour 100 par rapport à sa valeur primitive.

CONCLUSIONS

L'étude de la néphrite expérimentale du mouton montre que les lipides totaux varient d'une façon tout à fait irrégulière. Il serait intéressant de préciser le processus de cette évolution au cours de la maladie.

Le rapport d'extraction au contraire a diminué considérablement (dans la proportion de 5 à 1) dans quatre cas sur sept.

Les autres cas se répartissent ainsi :

Un mouton ayant reçu une dose trop faible de poison n'a présenté aucun symptôme de néphrite.

Le deuxième animal avait déjà fait une maladie sévère (clavelée) et son rapport d'extraction initial était faible, très inférieur au chiffre normal.

Chez le troisième mouton, enfin, la valeur initiale du rapport d'extraction était peu élevée ; la variation de ce paramètre a été insignifiante.

Au cours de la néphrite uranique du mouton, le système lipoprotéidique du sérum subit donc une évolution identique à celle que nous avons observée chez les génisses inoculées avec le virus de la vaccine.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — PASTEUR VALLERY-RADOT, DEROT et GAUTHIER-VILLARS (Mlle) : Néphrites avec azotémie oscillante et albuminurie chez le lapin au cours de l'intoxication prolongée par le bismuth.
C. R. Soc. Biol., 1931, 108, 451.
 - 2 — BARTFIELD (B.) : Über die subcutane Uranvergiftung der Kaninchen.
Bioch. Zeitschr., 1922, 129, 534.
 - 3 — GARNIER (M.), SCHULMANN et MAREK : Toxicité du nitrate d'urane en injection sous cutanée chez le lapin.
C. R. Soc. Biol., 1928, 99, 269.
 - 4 — MAURIAC (P.) et SERVANTIE : Azotémie expérimentale et régime lacté chez le lapin atteint de néphrite chronique à l'urane.
C. R. Soc. Biol., 1930, 105, 921.
 - 5 — MARTIN (L.) et PETTIT : Néphrite et cirrhose hépatique chez le lapin soumis à l'alimentation lactée.
Ann. Inst. Pasteur, 1913, 27, 532.
 - 6 — PASTEUR VALLERY-RADOT : Néphrites épithéliales et interstitielles d'origine expérimentale. Azotémie.
C. R. Soc. Biol., 1918, 81, 463.
 - 7 — GARNIER (M.) et MAREK : Effets de doses croissantes de nitrate d'urane en injections sous cutanées chez le lapin.
C. R. Soc. Biol., 1931, 108, 651.
 8. — DELAGE (B.). Le système lipoprotéidique du sérum au cours de la néphrite expérimentale au nitrate d'urane.
C. R. Soc. Biol., 1938, 128, 735.
-

CHAPITRE V

ÉTUDE SOMMAIRE D'AUTRES MALADIES

Nous rapportons ici des chiffres que nous avons pu déterminer à l'occasion de recherches tout à fait différentes ; ils ne constituent qu'une ébauche d'étude. S'ils ne nous permettent pas de tirer des conclusions fermes, ils peuvent néanmoins servir à nous orienter et à confirmer d'autres résultats mieux établis.

I. — CLAVELÉE CHEZ LE MOUTON

1) *Maladie naturelle.* Un mouton porteur de nombreuses pustules claveleuses fut saigné. Son état général était fort mauvais et il fut sacrifié pour d'autres recherches.

Le rapport d'extraction était très bas : $R = 0,16$.

cc. d'alcool ...	1 cc.	2 cc.	3 cc.	4 cc.	5 cc.	6 cc.	L. T.
mgr. lipides ..	3.4	3.6	5.4	6.0	4.8	5.6	36.4

2) *Maladie expérimentale.* Un autre mouton appartenant depuis un certain temps à l'Institut Pasteur fut employé pour nos recherches sur la néphrite uranique. A la première

saignée, avant inoculation, le rapport d'extraction était très bas : $R = 0.24$. Nous apprîmes par la suite qu'il avait été inoculé avec du virus claveleux quelques semaines plus tôt.

Il semble donc qu'une maladie sévère comme la clavelée chez le mouton amène une rétrogradation de l'extractibilité et une chute importante du rapport d'extraction.

II. — TYPHUS EXPÉRIMENTAL CHEZ L'ÂNE

À la suite des recherches de Ch. NICOLLE et E. CONSEIL [1] sur l'inoculation du typhus exanthématique à l'âne, G. BLANC et L. A. MARTIN [2] ont montré que cet animal, inoculé avec le virus du typhus murin fait une maladie fébrile très bénigne qui n'affecte pas son état général.

L'extractibilité des lipides sériques reflète bien l'évolution de la maladie.

	Avant l'inoculation						
	1,5	2	2,5	3	4	5	L. T.
cc. d'alcool	1,5	2	2,5	3	4	5	L. T.
mgr. lipides	7,6	19,1	48,3	70,5	70,8	61,8	108,0
$R_1 = 0.65$							
	Après l'inoculation						
		2	2,5	3	4		L. T.
cc. d'alcool		2	2,5	3	4		L. T.
mgr. de lipides		18,4	74,2	67,0	73,0		117,4
$R_2 = 0.63$							

Le rapport d'extraction reste en effet normal chez cet animal qui n'a présenté qu'une maladie fébrile très bénigne.

III NÉPHROSE LIPOÏDIQUE CHEZ L'HOMME

Ayant eu à examiner un sérum provenant d'une malade atteinte de néphrose lipoidique, nous avons déterminé le rapport d'extraction. Il s'agissait d'une femme de 26 ans chez laquelle les symptômes de cette affection s'étaient déclarés à la suite de traumatismes.

Nous avons d'abord pu confirmer le diagnostic en faisant le bilan des grandes fractions protéidiques et lipidiques du sérum.

MACHEBŒUF et WAHL ont montré en effet [3] que, dans la néphrose lipoïdique, il y avait augmentation considérable des lipides albuminiques. L'*index lipoalbuminique* de ces auteurs (quantité de lipides entraînée par 100 gr. de sérines), inférieur à 10 chez les individus normaux, s'élève à 25 au cours de certaines maladies mais dépasse 50 et atteint parfois 90 chez les néphrosiques.

Les chiffres expérimentaux sont les suivants (en gr. par l. de sérum) :

Globulines	45 gr. 00	Lipides des globulines ..	3 gr. 89
Albumines	9 gr. 63	Lipides des albumines ..	7 gr. 32
Protéides totaux	54 gr. 63	Lipides totaux	11 gr. 21
Index lipoalbuminique	76		
Maximum de lipides extraits à froid	5 gr. 64		
Rapport d'extraction	R = 0.52		

On voit donc que, chez cette malade tout au moins, le rapport d'extraction était normal.

CONCLUSIONS

Ces recherches auraient lieu, bien entendu, d'être confirmées par l'observation d'un plus grand nombre de cas.

Elles nous montrent tout de même que dans une maladie grave, la clavelée chez le mouton, le rapport d'extraction est abaissé et qu'au contraire dans une maladie bénigne, le typhus murin chez l'âne, ce paramètre est à peine modifié. L'observation de néphrose lipoïdique que nous avons rapportée, par son allure chronique, par son évolution lente se range dans cette dernière catégorie.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — NICOLLE (Ch.) et CONSEIL (E.): Production d'un sérum expérimental préventif du typhus exanthématique.
Arch. Inst. Past. Tunis, 1925, 14, 355.
 - 2 — BLANC (G.) et MARTIN (L. A.): Sensibilité de l'âne au virus de typhus murin.
C. R. Soc. Biol., 1936, 120, 322.
 - 3 — MACHEBEUF (M.) et WAHL (R.): Recherches biologiques sur la néphrose lipoïdique. 1^{er} Mémoire.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 486.
-

CHAPITRE VI

LE VIEILLISSEMENT DU SERUM

Les résultats précédemment exposés peuvent se résumer ainsi :

Le rapport d'extraction, tel que nous l'avons défini, est une constante physico-chimique d'un sérum déterminé ; avec toute une série de substances à fonction alcool ou cétone, l'allure et l'intensité de l'extraction restent sensiblement les mêmes. De plus, ce rapport présente une grande constance au cours des saignées espacées et varie peu sous l'influence des saignées répétées.

Au cours des infections graves au contraire, il subit une chute considérable, l'extractibilité des lipides par l'éther en présence d'alcool à froid ayant très fortement rétrogradé. Nous avons étudié ce phénomène dans certains états pathologiques et montré que la chute du rapport d'extraction constitue un test tout à fait remarquable de l' « état de maladie grave ».

On sait que le sérum conservé *in vitro* subit une évolution incessante et nombreux sont les auteurs qui ont étudié les variations de ses caractéristiques physiques. Aussi, nous a-t-il paru logique de compléter notre étude du système lipoprotéidique du sérum par celle de son comportement au cours du vieillissement [1].

DESCRIPTION DU PHENOMENE

I. — MODE OPÉRATOIRE

Des expériences comparatives ont été effectuées avec du sérum frais et conservé aseptiquement *in vitro*. Il était nécessaire de prélever une quantité assez importante de sang (500 à 1.000 cc par exemple) pour pouvoir faire des mesures successives ; aussi nous sommes-nous toujours adressés à de gros animaux (équidés, bovidés).

Une partie du sérum, récolté aseptiquement, était immédiatement mise en œuvre et servait à déterminer la courbe d'extraction du sérum frais. Le reste était conservé à la glacière à une température moyenne de $+ 4^{\circ}$.

Après un certain temps, le sérum, sorti de la glacière, était laissé pendant quelques heures sur la table du laboratoire. Quand l'équilibre de température était atteint, on en prélevait aseptiquement la quantité nécessaire pour tracer une nouvelle courbe d'extraction. Le reste du sérum était remis à la glacière et les opérations que nous venons de décrire étaient recommencées après un nouveau temps de conservation.

II. — RÉSULTATS GÉNÉRAUX

Les résultats obtenus sont tout à fait curieux.

Le vieillissement diminue fortement l'extractibilité des lipides.

Au bout d'un certain temps de conservation à la glacière (généralement un à trois mois) la quantité maxima de lipides qu'on peut extraire à froid par l'éther en présence de petites quantités d'alcool subit une chute très importante ainsi que le rapport d'extraction qui lui est proportionnel.

Cette évolution du sérum vers l'état d'inextractibilité des lipides est tout à fait générale. Nous l'avons toujours observée.

III. — CHIFFRES EXPÉRIMENTAUX

Les résultats sont exprimés en mgr. de lipides pour 25 cc de sérum, 25 cc d'éther et les quantités d'alcool indiquées.

Tableau I. — L'extractibilité n'a pas varié pendant les quinze premiers jours; le plateau est resté large. Au quatrième mois, le plateau est devenu un maximum en pointe dont l'ordonnée a diminué. La courbe d'extraction du 5 juillet représente sans doute une courbe critique, intermédiaire entre l'extractibilité normale et l'inextractibilité.

Sérum cheval, 2 mars 1934.
Alcool éthylique

Volume d'alco.	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	Lipides totaux
5 mars 1934 .		27.6	33.0	32.3	34.5	37.1	48.0
12 mars 1934 .	4.3	30.5	37.3	32.0	38.9	35.7	
20 mars 1934 .	2.5	26.1	32.1	32.5	36.2	35.1	48.7
5 juillet 1934 .		5.0	7.2	24.6	10.8	11.2	

Tableau II. — On a comparé l'action de l'alcool méthylique à celle de l'alcool éthylique. Le phénomène a évolué de la même façon avec ces deux alcools : Chute en moins de trois mois de 35,4 à 9,6 avec déplacement du maximum vers les abscisses élevées.

Sérum cheval, 12 avril 1934.
Alcool éthylique

Volume d'alcool	Alcool éthylique			Alcool méthylique				Lipides totaux
	3 cc	4 cc	5 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	
17 avril 1934 ...	35.4	33.4	26.3	8.5	34.9	31.0	26.6	44.5
25 avril 1934 ...	35.2	32.2	25.7		35.1	30.9		
10 juillet 1934 ..	7.0	8.0	9.6	3.6		7.4	8.8	

Tableau III. — L'extractibilité est restée la même au quinzième jour (42,3 et 42,2). Au 35° jour, elle tombait à 6,7, mais au 68° jour il y avait amorce de réversibilité (35,5 chiffre vérifié sur une autre prise d'essai 35,1) et finalement retour à l'inextractibilité (9,5) un an après.

Dans ce cas tout à fait isolé, il y a eu amorce de réversibilité, mais finalement retour à l'état d'inextractibilité.

Le manque de sérum ne nous a pas permis de pousser plus loin l'observation de ce cas.

Sérum cheval, 12 septembre 1934.
Alcool éthylique

Volume d'alcool	1 cc	1 cc5	2 cc	2 cc5	3 cc	3 cc5	4 cc	5 cc	6 cc	Lip. tot.
13 sept. 1934	6.0	7.5	19.5		42.3			27.0	25.0	66.7
28 sept. 1934		5.1	4.6	23.4	42.2	29.4	28.0			66.5
17 oct. 1934 .			4.8	3.6	6.7	7.6	7.9	4.2		67.3
20 nov. 1934		4.6	2.8	5.3	35.5 35.1		13.0	7.7		
15 oct. 1935 .					9.5		10.2			

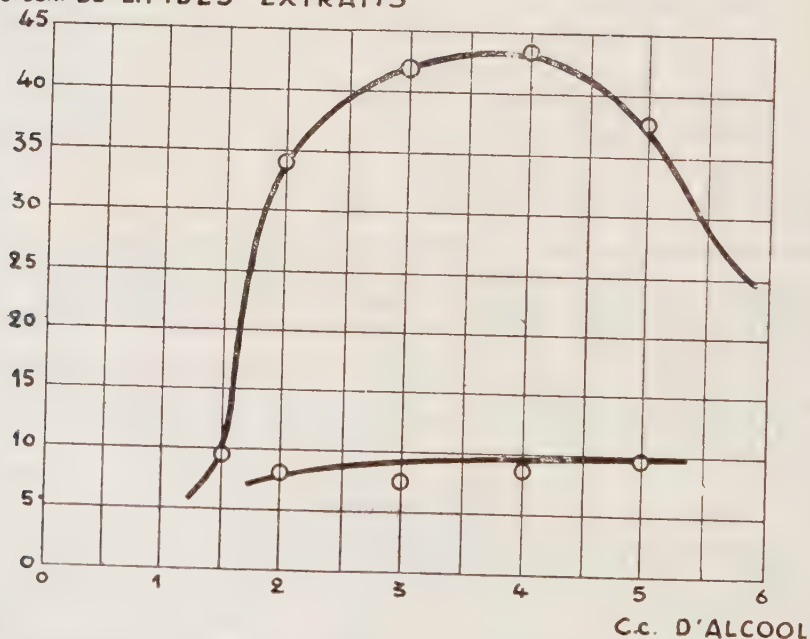
L'évolution vers l'état d'inextractibilité qui se produit au bout d'un certain temps de conservation a été encore observée pour les sérums dont l'examen est consigné dans les tableaux suivants :

Tableau IV. — Durée de conservation, un an.

Sérum cheval, 19 octobre 1934.
Alcool éthylique

Volume d'alcool	1 cc5	2 cc	3 cc	3 cc5	4 cc	4 cc5	5 cc	6 cc	Lip. tot.
23 oct. 1934 ..	3.5	18.6	40.0	40.0	37.0	37.4	30.0	30.0	
20 nov. 1934 ..	3.2	19.6	39.5	36.6					48.0
9 oct. 1935 ..		4.4	3.8		5.8		6.3		51.8

MGR. DE LIPIDES EXTRAITS



SÉRUM DE CHEVAL DU 19 OCTOBRE 1934

COURBE SUPÉRIEURE 23 OCTOBRE 1934

COURBE INFÉRIEURE 9 OCTOBRE 1935

Tableau V. — Durée de conservation, six mois.

Sérum cheval, 6 avril 1935

Alcool éthylique

Volume d'alcool	1 cc 5	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	Lipides totaux
8 avril 1935 ...	8.5	49.9	54.1	55.6	49.1	56.6
2 octobre 1935	—	5.6	6.2	9.8	10.9	57.3
8 octobre 1936	—	9.1	9.4	13.8	11.0	—

Tableau VI. — Même résultat pour un sérum qui, au bout d'un an, fut trouvé souillé bactériologiquement.

Sérum cheval, 16 octobre 1934 (non aseptique)

Alcool éthylique

Volume d'alcool	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	Lipides totaux
17 octobre 1934	5.0	29.7	42.8	38.8	57.8
31 octobre 1935	7.4	9.8	9.1	10.7	58.7

Tablea VII. — Chiffres se rapportant à un sérum de génisse. Même phénomène qu'avec le sérum de cheval.

Sérum génisse 67, 4 avril 1937

Alcool éthylique

Volume d'alcool	3 cc	3 cc 5	4 cc	Lipides totaux
5 avril	54.2	54.3	56.1	68.9
15 septembre	8.5	7.6	9.1	

Tableau VIII. — L'analyse d'un sérum thérapeutique (sérum antitétanique) conservé depuis plusieurs années nous a montré qu'il y avait aussi dans ce cas rétrogradation de l'extractibilité.

D'autres chiffres, relatifs à un sérum antidiphthérique périmé en sont une autre confirmation.

Sérum antitétanique à 3.000 Unités

Alcool éthylique

Volume d'alcool	0 cc	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	Lipides totaux
22 juillet 1936	6.6	6.0	7.3	7.8	7.3	8.3	11.7	56.3 58.1

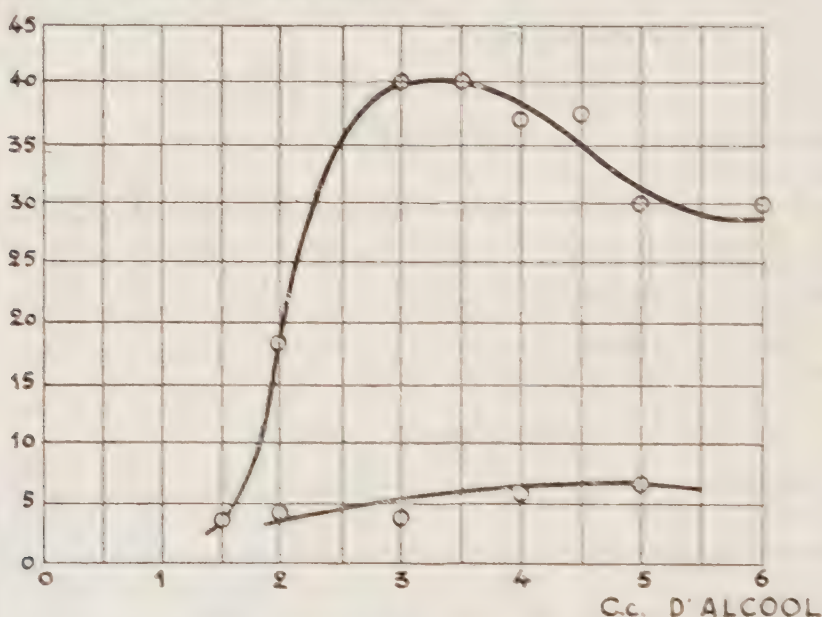
Tableau IX. — Chiffres se rapportant à un sérum dont la teneur en lipides était élevée. Il provenait d'un cheval qui avait été soumis à des saignées répétées

Sérum de cheval, 12 avril 1935

Alcool éthylique

Volume d'alcool	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	Lipides total
4 mai 1936 ...	9.4	34.0	42.0	43.4	37.9	54.3
13 avril 1935 ..	8.1	8.1	7.6	8.8	9.7	52.5

MGR DE LIPIDES EXTRAITS



SÉRUM DE CHEVAL DU 12 AVRIL 1935

COURBE SUPÉRIEURE 13 AVRIL 1935

COURBE INFÉRIEURE 4 MAI 1936

IV. — ÉVOLUTION DU PHÉNOMÈNE

Etudions maintenant l'évolution de cet accroissement de la stabilité des lipides au contact du mélange alcool - éther en fonction de la durée de conservation du sérum in vitro

L'examen des aspects successifs de la courbe d'extraction nous permet d'établir les faits suivants :

Pendant un certain temps que, par analogie avec le phénomène décrit par MACHEBEUF et SANDOR [2] on peut appeler *temps de conservation préparatoire*, la courbe reste inchangée. Puis après un temps variable suivant le sérum considéré mais qui est généralement de un à trois mois, une différence brusque se manifeste entre deux courbes successives. La première est superposable à la courbe initiale, la deuxième est aplatie sur l'axe des abscisses : son ordonnée maxima dépasse à peine l'ordonnée à l'origine (lipides extraits par l'éther seul).

Le hasard permet quelquefois de saisir un intermédiaire entre la courbe d'extraction du sérum frais (extractibilité normale) et la courbe du sérum longtemps conservé (inextractibilité). Cet état de transition paraît être instable et avoir une durée assez brève. Le sérum dont l'étude est consignée dans le tableau I constitue un exemple d'un tel stade intermédiaire.

Le phénomène présente donc deux aspects caractéristiques :

1° Il évolue brusquement. Il est exceptionnel de pouvoir saisir un intermédiaire entre la courbe du sérum frais et celle du sérum ayant subi une longue conservation.

2° Il est irréversible. Une seule fois nous avons pu observer une amorce de reversibilité mais il y a eu finalement retour à l'état d'inextractibilité.

AUTRES PHENOMENES OBSERVES AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Cette modification que subit le sérum sanguin au cours de sa conservation *in vitro* vient s'ajouter à celles qui ont été observées par d'autres auteurs.

Au cours du vieillissement, la conductivité électrique augmente (BUGLIA) [3] ainsi que la viscosité (BUGLIA et PIZZAMANTI). La tension superficielle décroît (LECOMTE DU

NOÛY [4]. Le poids moléculaire de la globuline varie avec la température et la durée de conservation (Mme A. ROCHE et J. BRACCO) [5].

Les propriétés sérologiques varient également : le pouvoir flocculant d'un sérum tuberculeux diminue avec le temps (BRETON) [6] : le sérum d'un individu sain, après un certain temps de conservation, peut donner une réaction de VERNES positive [7].

Plus récemment, Mme A. ROCHE et F. MARQUET [8] ont étudié le précipité qui se forme peu à peu dans les sérums conservés à 0° : il contient une proportion assez forte de lipides (environ 20 p. 100). Bien que le phénomène soit quantitativement peu important, il n'est pas impossible qu'il contribue à rompre l'équilibre normal du système lipoprotéidique dans le sens que nous avons indiqué.

CONCLUSIONS

Sous l'influence du vieillissement, la résistance des lipides du sérum à l'action du mélange alcool-éthéré à froid s'accroît considérablement.

Ce phénomène ne se produit qu'après un certain *temps préparatoire de conservation in vitro*, qui est de l'ordre de un à trois mois.

La courbe d'extraction du sérum vieilli se différencie de celle du sérum frais par les caractères suivants :

a) L'ordonnée du plateau est de trois à cinq fois moindre de même que le rapport d'extraction qui lui est proportionnel.

b) Le maximum d'extraction est déplacé vers les abscisses croissantes.

Le phénomène d'inextractibilité des lipides du sérum vieilli présente les caractéristiques suivantes :

1) Il se produit brusquement.

2) Il est irréversible.

En résumé nous avons décrit une transformation physico-chimique très considérable du système lipoprotéidique du sérum sous l'influence du vieillissement et qui consiste en une augmentation de la stabilité des lipides dans le système lipoprotéidique.

APPLICATION DES PROPRIETES DU SERUM VIEILLI

VÉRIFICATION INDIRECTE DE NOTRE HYPOTHÈSE SUR LES RELATIONS ENTRE LA TENSION INTERFACIALE ET L'EXTRACTIBILITÉ

En étudiant les facteurs physico-chimiques de l'extractibilité, nous avons supposé que l'abaissement de tension interfaciale provoqué par l'introduction dans le système (sérum-éther) de certaines substances était une condition de l'extraction lipidique. Mais la vérification de cette hypothèse est difficile car il se forme aux interfaces des émulsions très stables : aussi avons-nous dû limiter notre contrôle expérimental à des solutions de sérum au dix-millième.

L'expérience que nous rapportons ici constitue une vérification, indirecte il est vrai, mais portant sur le sérum non dilué, de notre troisième hypothèse.

Rappelons ici les données que nous avons établies et sur lesquelles elle est basée.

1) Si l'on abaisse la température, l'extractibilité des lipides du sérum frais subit une diminution qui est en réalité la résultante de deux processus agissant en sens contraire :

a) L'activité moins grande du mélange éther-alcool sur le système lipoprotéidique du sérum.

b) La diminution de l'énergie superficielle à l'interface sérum-éther.

Le sens du phénomène résultant est tel que le premier l'emporte en valeur absolue sur le second.

2) L'extractibilité des lipides dans le sérum vieilli *in vitro* est fortement diminuée.

Voici maintenant l'expérience qui a été faite.

On détermine les courbes d'extraction d'un sérum de cheval :

1) Sérum frais. Elle est normale. Le maximum d'extraction se produit pour 4 cc d'alcool.

2) Sérum conservé un an en glacière :

a) Extraction faite à 20°.

b) Extraction faite à 4°.

Sérum de cheval du 12 avril 1935

Volume d'alcool		1 cc 5	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	5 cc 5	6 cc 5
13 Avril 1935	t = 20°	9.4	34.0	42.0	43.4	37.9		
	t = 20°	8.1	8.1	7.6	8.8	9.7	15.1	22.5
4 Mai 1936	t = 4°	7.8	8.8	10.1	14.5	33.9	23.3	8.3

Les chiffres établissent que l'extraction est plus considérable à 4° qu'à 20°. De plus à cette dernière température l'optimum d'extraction est déplacé vers les concentrations alcooliques élevées.

Ainsi malgré l'activité chimique moindre du mélange alcool-éther à basse température, le phénomène résultant est tel que l'extraction est plus considérable à 4° qu'à 20°. Le seul facteur que puisse augmenter l'extractibilité est l'abaissement de la tension interfaciale sérum-éther.

Il se trouve bien démontré ainsi que l'abaissement de l'énergie superficielle à la surface de séparation des micelles lipoprotéidiques et de l'éther est une condition nécessaire de l'extractibilité des lipides sériques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — DELAGE (B.): Liaisons lipides-protéides et vieillissement du sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol., 1936, **18**, 1304.
- 2 — MACHEBŒUF (M.) et SANDOR : Recherches sur la nature et la stabilité des liaisons protéides-lipides du sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol., 1932, **14**, 1168.

- 3 — BUGLIA (G.): Variazioni fisico chimiche del siero di sangue durante l'invecchiamento.
Arch. di Fisiologia, 1906, 4, 56.
- 4 — LECOMTE DU NOÛY: Equilibres superficiels des solutions colloïdales.
Paris, *Masson*, 1 vol. (1929).
- 5 — ROCHE (Mme A.) et BRACCO (J.): Pression osmotique et poids moléculaire des globulines du sérum.
Bull. Soc. Chim. biol., 1934, 16, 1479.
- 6 — BRETON: Influence du vieillissement sur les sérums soumis à la réaction de Vernes à la résorcine.
C. R. Soc. Biol., 1928, 98, 1429.
- 7 — DOURIS (R.): Modifications sous l'influence du temps du sérum humain normal ou syphilitique.
C. R. Ac. Sc., 1918, 167, 738.
- 8 — ROCHE (Mme A.) et MARQUET (F.): Recherches sur le vieillissement du sérum.
C. R. Soc. Biol., 1935, 119, 1147.
-



CINQUIÈME PARTIE

ESSAIS DE GÉNÉRALISATION ET
D'INTERPRÉTATION DES FAITS



CHAPITRE I

ETUDE SOMMAIRE DE L'ETAT DES LIPIDES DANS LE LAIT

Il nous a paru intéressant de savoir si le comportement particulier du sérum vis-à-vis de l'éther agissant en présence d'alcool n'était pas un phénomène plus général. Aussi avons-nous fait quelques essais en remplaçant le sérum par un autre liquide biologique contenant des lipides : le lait.

TECHNIQUE

La technique employée est très voisine de celle que nous utilisons pour l'étude des lipides extractibles à froid du sérum.

Dans une série d'ampoules à décanter on introduit 25 cc de lait, 25 cc d'éther et des quantités croissantes d'alcool éthylique à 96°. Après agitation énergique, on laisse en contact un certain temps. La couche aqueuse est soutirée et agitée à deux reprises, avec 10 cc d'éther chaque fois. Ces fractions éthérées de deuxième et de troisième extraction sont réunies avec la liqueur de première extraction dans une fiole de FOURNEAU tarée. On évapore à basse température et on sèche à l'étuve à 50° pendant 8 heures. Le beurre, extrait par la liqueur éthéro-alcool-ammoniacale d'ADAM est séché dans les mêmes conditions. Au sortir de l'étuve, les fioles sont placées dans l'exsiccateur à acide sulfurique où l'on fait le vide; après quinze à vingt heures, on reprend par l'éther anhydre,

on filtre aussi rapidement que possible, on évapore et on sèche pendant une heure à l'étuve à 50°. On pèse après avoir laissé les fioles de FOURNEAU pendant 15 à 20 heures dans le vide en présence d'acide sulfurique.

RÉSULTATS

Voici les résultats de trois séries d'essais :

I. Temps de contact : 9 heures

Volume d'alcool	0 cc	0 cc 5	1 cc	2 cc	4 cc	8 cc	Lipides totaux
mgr. de lipides extraits.	204	200	228	225	862	869	868 877 } 872

II. Temps de contact : 15 heures

Volume d'alcool	0 cc	1 cc	1 cc 5	2 cc	3 cc	5 cc	Lipides totaux
mgr. de lipides extraits.	182	188	188	189	340	858	854 867 } 860

III. Temps de contact : 15 heures

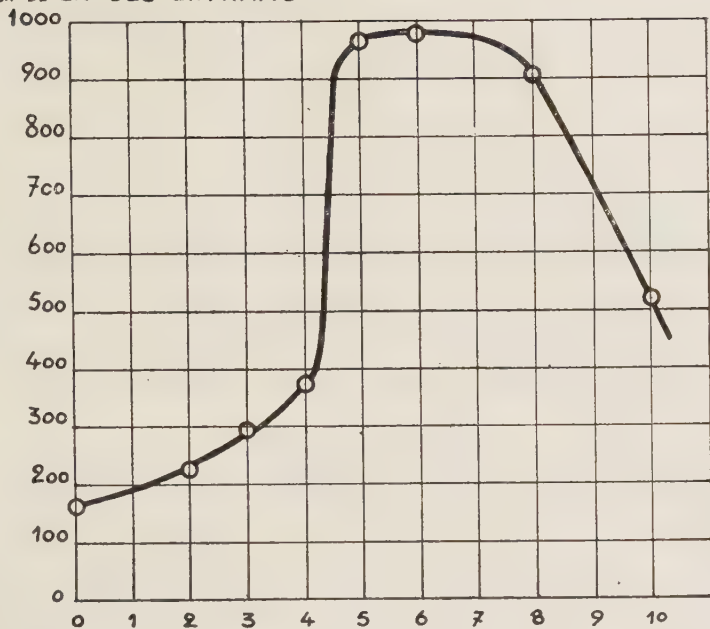
Volume d'alcool	0 cc	2 cc	3 cc	4 cc	5 cc	6 cc	8 cc	10 cc	Lipides totaux
mgr. de lipides extraits	162	228	297	372	967	979	907	520	988 983 } 985

La courbe d'extraction du lait présente avec celle du sérum des analogies et des différences.

Les analogies sont d'ordre qualitatif : l'allure de la courbe est sensiblement la même.

Elle débute par un palier : l'addition de petites quantités d'alcool n'augmente guère l'extraction étherée. Puis brusquement, à partir d'une certaine concentration critique (qui est du même ordre de grandeur que pour le sérum) la courbe monte brusquement jusqu'à un plateau pour diminuer ensuite beaucoup plus lentement.

MGR DE LIPIDES EXTRAITS



Cc. d'ALCOOL

EXTRACTION ALCOOLO-ETHERÉE DE LAIT

Les différences avec le sérum sont cependant très nettes :

1.) Une partie importante des lipides est extractible par l'éther seul à froid (23, 21 et 17 pour 100 des lipides totaux) en moyenne le cinquième des lipides totaux, alors que pour le sérum cette proportion est insignifiante.

2.) La totalité des lipides est extractible par l'éther additionné de la quantité optima d'alcool. Celle-ci est de l'ordre de 20 à 25 % du volume de sérum.

Ces analogies masquent les différences profondes d'union des lipides aux protéides dans le sérum et dans le lait.

Le simple centrifugation suffit en effet à délipider presque complètement le lait. Les liaisons qui unissent les lipides aux protéides y sont donc très labiles ; elles sont de nature physique et d'intensité très faible (mesurable par exemple par la vitesse que prennent les particules de lipides dans un champ de forces connu).

CONCLUSIONS

1° Les courbes d'extraction du lait et du sérum présentent une certaine analogie d'allure : début lent, montée rapide, maximum en plateau et diminution des quantités de lipides extraites lorsque la quantité d'alcool dépasse l'optimum.

2° Les différences d'ordre quantitatif qui existent entre les deux phénomènes sont les suivantes : le cinquième des lipides totaux environ est extractible par l'éther seul. La totalité l'est par l'éther en présence de 20 p. 100 d'alcool environ.

3° La nature des liaisons protéides-lipides dans le lait et dans le sérum sont bien différentes cependant puisque la simple centrifugation suffit à séparer à peu près quantitativement les lipides du lait.

L'ensemble de ces faits nous conduit à penser que le lait ne contient pas de cénapses lipoprotéidiques, mais on peut envisager l'existence d'un système lipo-lipidique de structure analogue : les groupements éléiques seraient orientés à l'intérieur et plus ou moins liés entre eux, les groupements hydrophiles à l'extérieur et hydratés. Mais la proportion de ceux-ci ne serait plus suffisante pour stabiliser complètement le système, aussi 20 p. 100 des lipides sont-ils extraits par l'éther, la totalité l'est par l'éther en présence de la quantité optima d'alcool.

Ce schéma rend compte de l'extractibilité limitée des lipides du lait par l'éther.

CHAPITRE II

EXTRACTIBILITÉ COMPARÉE DES LIPIDES LIÉS AUX GLOBULINES ET AUX ALBUMINES DU SÉRUM SANGUIN

Nous avons montré qu'au cours de certains états pathologiques le système lipoprotéidique du sérum subit une évolution qui se traduit de la manière suivante :

1° L'énergie de liaison des lipides aux protéides augmente considérablement. Les lipides deviennent beaucoup plus résistants à l'extraction éthéro-alcoolique à froid [1], [2].

2° L'index albuminique (rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$) subit une chute notable [2].

Le sérum normal, après un certain temps de conservation *in vitro*, présente des modifications analogues [3]. [4].

On peut se demander s'il y a corrélation entre cette diminution de l'extractibilité des lipides et l'augmentation de précipitabilité des protéides sériques.

RECHERCHES ANTERIEURES

Ce problème avait déjà préoccupé certains auteurs ; ils admettaient généralement que certaines substances lipoïdiques sont liées assez énergiquement avec les globulines mais

que les liens qui unissent les lipides avec les albumines sont extrêmement labiles. Mais les procédés expérimentaux mis en œuvre pour justifier de telles conclusions ne sont pas à l'abri de la critique, comme nous allons le montrer.

Rappelons brièvement les travaux principaux relatifs à cette question :

HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE (1925) concluent de leurs recherches [5] que plus il y a d'euglobuline dans un sérum, moins on peut extraire de cholestérol par l'éther ; plus il y a d'albumine, plus les liaisons lipides-protéides sont lâches ; seuls les complexes formés par l'association du cholestérol avec les globulines seraient caractéristiques.

Dans les conditions d'agitation et de température réalisées au cours de ces expériences la structure lipoprotéidique subit une altération considérable, aussi les conclusions de ces auteurs semblent-elles un peu prématurées.

TROENSEGAARD et KOUDAHL (1926) préparent les globulines et les albumines en utilisant la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium [6]. Par des opérations de coagulation et de déshydratation ils amènent les protéides à l'état pulvérulent.

De la poudre albuminique on peut extraire par l'éther à froid une quantité de substances lipoïdiques assez considérable alors que la poudre globulinique n'en livre que des traces.

Les globulines contiennent pourtant du cholestérol car leur acétylation donne des carbures d'hydrogène qui permettent d'identifier ce stérol. Les auteurs considèrent le cholestérol comme un groupement prosthétique des globulines.

RECHERCHES PERSONNELLES

Ces travaux sont intéressants mais ne suffisent pas à clore le débat.

L'objection qu'on peut faire à leurs auteurs est grave : ils ont opéré sur des protéides dénaturés et qui sont par conséquent dans un état physico-chimique profondément différent de celui des protéides naturels.

On ne peut admettre sans preuve, et d'ailleurs la question ne s'est sans doute pas présentée à l'esprit de ces auteurs, que les liaisons lipides-protéides subsistent sans modifications au cours des processus de dénaturation. Le simple vieillissement du sérum *in vitro*, nous l'avons montré [3] augmente considérablement la stabilité du système lipoprotéidique.

C'est pourquoi, utilisant la méthode déjà décrite, basée sur les travaux de MACHEBŒUF et SANDOR [7] nous avons repris l'examen de ce problème en étudiant comparativement les lipides extractibles à froid par l'éther en présence de petites quantités d'alcool à partir des globulines et des albumines isolées du sérum.

MODE OPÉRATOIRE

On fractionne par le sulfate d'ammonium à demi-saturation les protéides d'une quantité assez importante de sérum (200 cc par exemple).

Après dissolution des précipités protéidiques, on amène le volume de chacune des solutions globulinique et albuminique à celui du sérum dont on est parti (*).

L'extraction est effectuée selon la technique habituelle (**) à partir de ces solutions protéidiques non dialysées (le sulfate d'ammonium ne modifie pas l'amplitude du phénomène). Nous en rappelons ici les grandes lignes :

25 cc de solution (globulinique ou albuminique)

25 cc d'éther

n cc d'alcool éthylique

dans une série d'ampoules à décanter. 1^{ère} agitation ; contact de 15 heures ; 2^{ème} agitation ; séparation de la phase éthérée, évaporation, reprise par l'éther anhydre ; évaporation, séchage, pesée de l'extrait lipoïdique.

(*) Les albumines se dissolvent toujours parfaitement dans une quantité d'eau assez faible, mais il arrive parfois que la dissolution complète des globulines nécessite un volume d'eau un peu supérieur. C'est à ce volume qu'on amène, dans ce cas, chacune des solutions.

(**) Voir 1^{re} partie, chapitre 2.

I. — SERUM DE CHEVAL. — 3 septembre 1937

	Sérum						Globulines						Albumines					
	0 cc		2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc	0 cc	2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc	0 cc	2 cc 5	3 cc	4 cc	5 cc		
	4.9	48.3	49.1	49.2	38.6	1.0	1.4	1.5	1.8	1.7	2.8	26.1	31.2	31.3	32.7			
Vol. d'alcool	79.4						27.2						52.2					
mgr. lipides																		
L. T.																		
R	0.61						0.07						0.63					

II. — SERUM DE CHEVAL. — 25 octobre 1937

	Sérum					Globulines					Albumines				
	0 cc	2 cc	3 cc	4 cc		0 cc	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc	0 cc	1 cc	2 cc	3 cc	4 cc
	4.0	31.5	36.6	36.7		1.3	1.4	2.2	2.3	2.3	3.5	11.1	22.4	25.4	26.8
Vol. d'alcool	66.8					23.4					43.4				
mgr. de lipides															
L. T.															
R	0.55					0.10					0.62				

Pour déterminer la totalité des substances lipoidiques liées aux globulines et aux albumines, on prélève 25 cc de chacune des solutions, on les précipite par l'alcool fort et on soumet les précipités ainsi obtenus à la lixiviation dans l'appareil à extraction continue de KUMAGAWA en suivant une technique déjà décrite. (*)

RÉSULTATS OBTENUS

La lecture des tableaux ci-joints nous montre que la valeur du rapport d'extraction est bien plus forte pour les albumines que pour les globulines (7 à 9 fois plus en moyenne). Celle du sérum est un peu inférieure à la première et très supérieure à la seconde [8].

Par l'éther en présence de petites quantités d'alcool, ce sont surtout des lipides albuminiques que l'on extrait.

Les lipides sont donc unis avec les globulines beaucoup plus énergiquement qu'avec les albumines comme le pensaient TROENSEGAARD et KOUDAHL.

Néanmoins, les liaisons que contractent les albumines avec les lipides sont telles qu'une partie assez importante de ces substances reste inextractible par l'éther en présence de petites quantités d'alcool à froid. Dans le sérum, c'est avec les globulines que sont liés en majeure partie les lipides qui résistent à l'action de ce réactif ; une fraction non négligeable de ceux-ci est cependant liée aux albumines.

Ce résultat ne pouvait être obtenu par les méthodes trop brutales employées par les auteurs que nous venons de citer.

D'ailleurs l'existence de la cénapse lipoalbuminique isolée par MACHEBŒUF [9] en 1928 apporte la preuve que certains lipides peuvent contracter avec les albumines des liaisons qui présentent une grande résistance à l'extraction étherée.

Nos résultats établissent qu'à chacune des fractions protéidiques du sérum sont liés des lipides qui diffèrent qualita-

(*) Voir 1^{re} partie, chap. 2.

III. — SERUM DE GENISSE. — 8 février 1938

	Sérum				Globulines				Albumines			
	0 cc	3 cc	3 cc 5	4 cc	0 cc	3 cc	3 cc 5	4 cc 5	0 cc	3 cc	3 cc 5	4 cc
	4.5	48.4	48.1	48.4	0.9	1.4	1.2	1.4	3.7	36.6	37.1	36.4
Vol. d'alcool.....	71.5				17.4				54.1			
mgr. lipides												
L. T.....												
R	0.69				0.08				0.72			

IV. — SERUM DE GENISSE. — 8 juin 1938

	Sérum				Globulines				Albumines			
	2 cc 5	3 cc	4 cc		2 cc 5	3 cc	4 cc		2 cc 5	3 cc	4 cc	
	71.0	71.4	68.2		2.1	2.4	2.3		68.1	68.3	67.4	
Vol. d'alcool												
mgr. lipides.....												
L. T.....	127.7				26.7				101.0			
R	0.56				0.09				0.68			

tivement entre eux par leur énergie de fixation aux protéides. Le mélange alcool-éthéré agissant à froid sépare la totalité des substances lipoïdiques fixées aux albumines et aux globulines en deux catégories : celles qui sont extraites par ce réactif et celles qui restent combinées aux protéides dans la phase aqueuse du sérum. Les proportions relatives de ces deux catégories de lipides sont tout à fait caractéristiques des grandes fractions protéïdiques du sérum : le rapport d'extraction est élevé pour les albumines ; il est faible pour les globulines.

Ainsi la diminution de l'extractibilité des lipides sériques et la baisse de l'index albuminique semblent bien avoir entre eux une relation directe.

Les résultats obtenus permettent peut être d'expliquer d'autres faits.

Un grand nombre de maladies, celle que provoque chez la génisse l'inoculation massive de virus vaccinal en particulier, sont accompagnées d'hypolipidémie. Or les globulines sont généralement liées à une moindre quantité de substances lipoïdiques que les albumines. Nous avons eu souvent l'occasion de vérifier ce fait. Chez le cheval le rapport $\frac{\text{lipides des albumines}}{\text{albumines}}$ (index lipoalbuminique et MACHEBŒUF et WAHL [10] est en moyenne deux à quatre fois plus élevé que le rapport $\frac{\text{lipides des globulines}}{\text{globulines}}$; chez la génisse on trouve des chiffres tout à fait analogues.

La teneur en protéides restant à peu près constante au cours de la maladie vaccinale, la diminution des albumines et l'augmentation concomitante des globulines se traduit par une baisse de la teneur en lipides totaux.

Il est difficile de savoir si ce phénomène explique quantitativement les faits observés, la proportion de lipides liée à chacune des fractions protéïdiques n'étant pas constante. On est en droit de penser qu'il y entre néanmoins pour une part importante.

CONCLUSIONS

Nous avons montré que les lipides étaient liés avec les globulines beaucoup plus énergiquement qu'avec les albumines. Une conclusion assez analogue avait été formulée par HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE et surtout par TROENSEGAARD et KOUDÄHL, mais elle ne peut s'appliquer qu'aux protéides dénaturés qu'ils ont étudiés. Elle n'est pas valable pour les globulines et les albumines naturelles, et c'est pourquoi nous avons repris cette question.

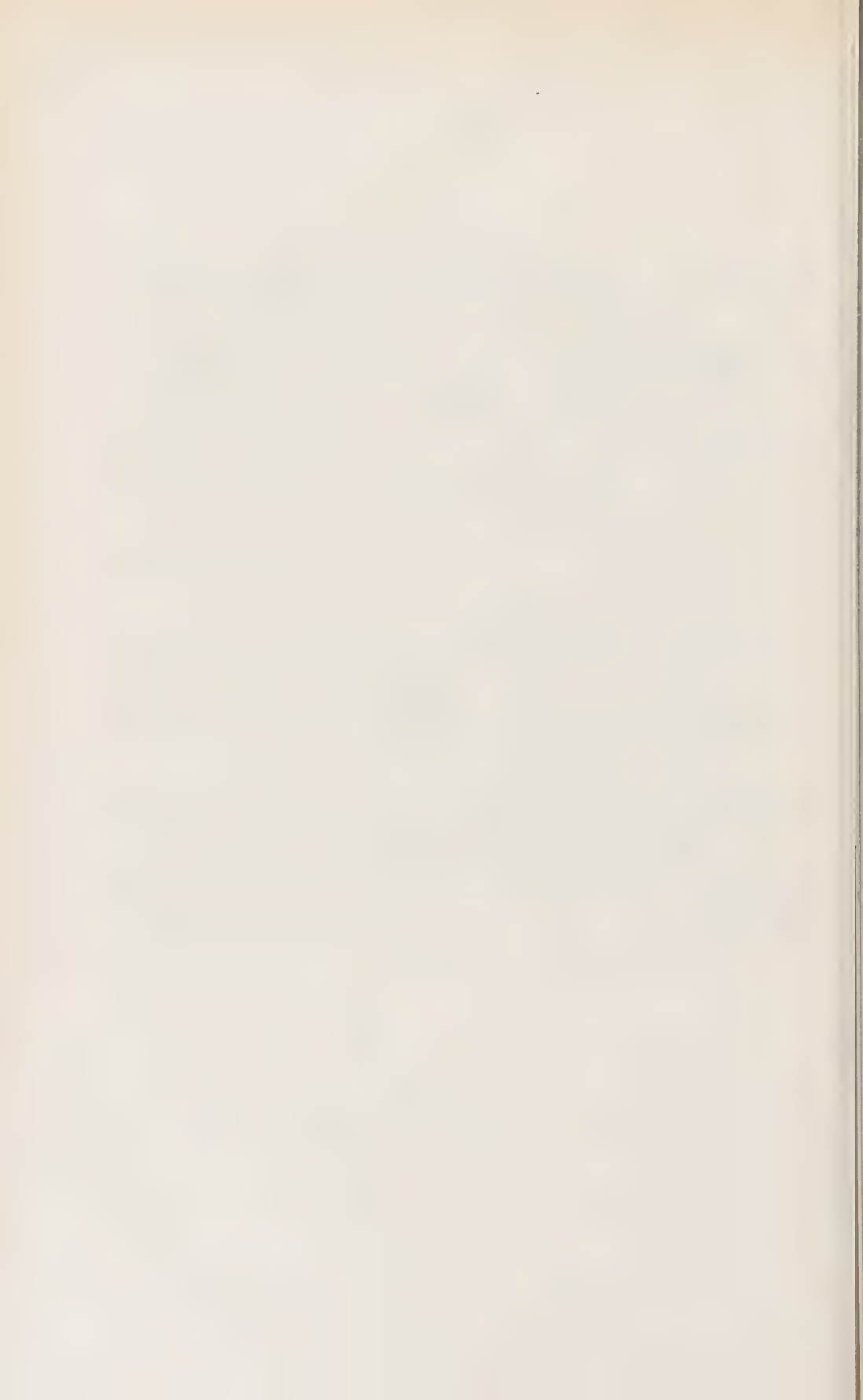
Des chiffres que nous avons obtenus il se dégage la conclusion suivante :

Non seulement le rapport $\frac{\text{lipides}}{\text{protéides}}$ est plus élevé pour les albumines que pour les globulines mais encore les systèmes lipoalbuminique et lipoglobulinique sont profondément différents : les lipides présentent à l'action du réactif alcoolo-étheré une stabilité beaucoup plus grande dans le second système que dans le premier.

Nos résultats établissent encore qu'une coordination existe entre des faits apparemment isolés : diminution des lipides totaux, augmentation de stabilité du système lipoprotéidique et chute de l'index albuminique, qui sont caractéristiques du sérum au cours de certains états pathologiques et du vieillissement *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — DELAGE (B.) : Extractibilité des lipides sériques par l'éther en présence d'alcool à froid en relation avec l'état de santé ou de maladie.
Bull. Soc. Chim. biol., 1935, 17, 938.
 - 2 — DELAGE (B.) : Recherches sur le sérum sanguin chez la génisse au cours de la maladie vaccinale.
Bull. Soc. Chim. biol., 1937, 19, 1407.
 - 3 — DELAGE (B.) : Liaisons lipides-protéides et vieillissement du sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol., 1936, 18, 1304.
 - 4 — MOLL (L.) : Über künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin.
Hofm. Beitr., 1904, 4, 563.
 - 5 — HANDOWSKY, LOHMANN et BOSSE : Untersuchungen über den Zustand des Cholesterins in Blutserum.
Pflügers Arch., 1925, 210, 63.
 - 6 — TROENSEGAARD et KOUDAHL : Cholesterin als prostethische Gruppe in Serumglobulin.
Hoppe Seyler's Ztschr. f. ges. phys. Chem., 1926, 3, 153.
 - 7 — MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.) : Recherches sur la nature et la stabilité des liaisons protéides-lipides du sérum sanguin.
Bull. Soc. Chim. biol., 1932, 14, 1168.
 - 8 — DELAGE (B.) : Extractibilité comparée des lipides des globulines et des albumines des sérums sanguins.
Bull. Soc. Chim. biol., 1938, 20, 892.
 - 9 — MACHEBŒUF (M.) : Thèse Doct. Sc., Paris (1928).
 - 10 — MACHEBŒUF (M.) et WAHL (R.) : Recherches biologiques sur la néphrose lipoidique. 1^{re} mémoire.
Bull. Soc. Chim. biol., 1931, 13, 486.
-



CHAPITRE III

DEUXIÈME DISCUSSION SUR LA NATURE DES PROTÉIDES SÉRIQUES LEURS RAPPORTS AVEC LES LIPIDES

Nous voudrions souligner le caractère tout à fait particulier de la stabilité des cénapses lipoprotéidiques et de l'énergie des liaisons lipides-protéides, pensant qu'il peut nous éclairer sur la nature physique des protéides sériques et sur les forces qui président à leur édification.

La stabilité des cénapses lipoprotéidiques varie avec les facteurs suivants :

1. La concentration en alcool (MACHEBŒUF et SANDOR)
2. Le temps de contact entre les phases sérique et éthérée (MACHEBŒUF et SANDOR).
3. Les différentes substances substituées à l'alcool dans le système (sérum-éther-alcool).

Les caractères essentiels de ces variations de stabilité sont les suivants :

Elles se font brusquement, de façon discontinue.

Elles ont une ampleur considérable.

Ces caractères sont aussi ceux des variations de l'énergie des liaisons lipides - protéides qui sont conditionnées par les facteurs suivants :

1. La concentration en ions hydrogène.

2. Le sérum lui-même. La discontinuité qui se manifeste entre deux courbes d'extraction successives peut revêtir les aspects suivants :

a) Evolution spontanée du sérum abandonné à lui-même *in vitro*. Elle se produit en quelques mois.

b) Evolution du plasma sanguin *in vivo* sous l'influence de la maladie. Elle se produit en quelques jours.

On ne peut manquer d'être frappé par l'identité d'aspect de la réponse du sérum au vieillissement *in vitro* et à l'évolution de la maladie *in vivo* : augmentation considérable et brusque de la stabilité des liaisons qui unissent lipides et protéides.

Ces observations constituent de nouvelles preuves d'une certaine « rigidité de constitution » (SANDOR) de la micelle lipoprotéidique. La mécanique, la thermochimie, l'électromagnétisme nous offrent de nombreux exemples de systèmes qui, invariants dans un certain domaine, évoluent rapidement dès qu'une certaine limite est dépassée.

*
**

Nous avons déjà discuté de la nature et des relations que contractent entre eux les protéides fractionnés par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Les différences que l'on peut saisir entre globulines et albumines sont surtout d'ordre physique (point isoionique, poids moléculaire) ; leur nature chimique nous est trop mal connue pour que nous puissions en tirer des caractères différentiels bien nets.

Nous avons dit ce qu'on pouvait penser de l'augmentation du rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globulines}}$ au cours de la maladie.

L'insuffisance de nos connaissances chimiques sur les protéides sériques fait que nous ignorons absolument s'il y a transformation chimique réelle ou simplement modification de la constitution physique. Celle-ci pourrait être sous la dépendance d'un tissu ou d'un organe dont le rôle serait de maintenir l'équilibre micellaire des protéides humoraux. L'é-

volution du sérum *in vitro* sous l'influence du vieillissement peut être due à une dénaturation partielle amenant une augmentation de la précipitabilité ou à une hydratation accrue des protéïdes.

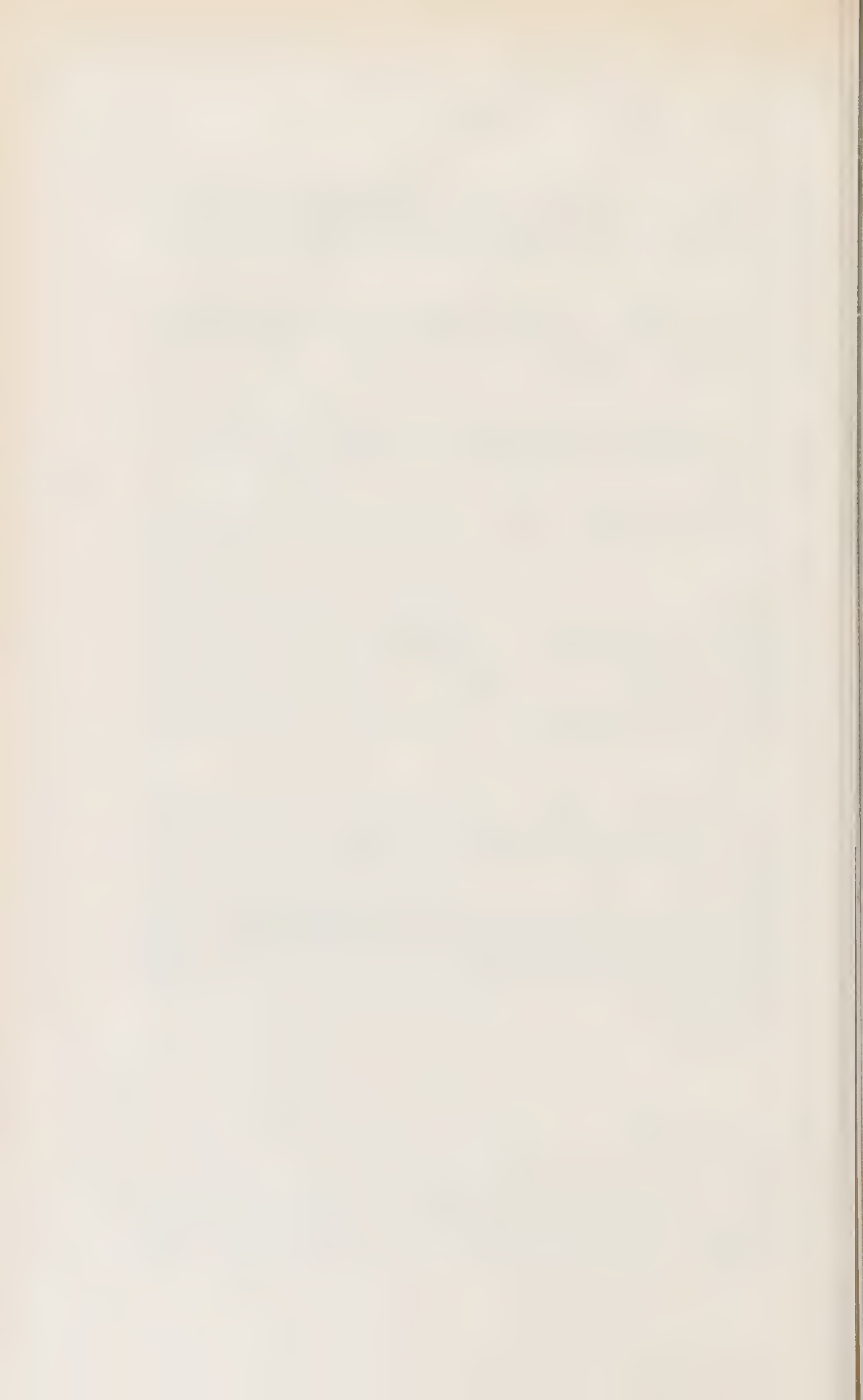
Nous sommes obligés d'appeler ce phénomène transformation de sérine en globuline, même s'il n'y a pas eu changement chimique puisque nous n'avons pas de définition chimique des protéïdes sériques.

L'étude que nous avons faite au cours de ce travail se rapporte surtout à la partie lipidique du sérum et contribue à notre connaissance du système lipoprotéïdique.

Elle établit que les lipides liés aux globulines sont beaucoup plus résistants que ceux des albumines à l'extraction éthéro alcoolique à froid. Or, au cours de la maladie vaccinale que nous avons particulièrement étudiée, les globulines augmentent et les albumines diminuent, leur somme restant sensiblement constante. Les albumines étant plus riches en lipides que les globulines, cette modification de l'équilibre micellaire se traduit par une diminution des lipides totaux et surtout par une augmentation de l'énergie de liaison des lipides aux protéïdes.

Nous n'avons pas essayé de donner une vérification quantitative de notre manière de voir. Elle serait illusoire. Le taux lipidique des albumines est plus élevé que celui des globulines mais leur rapport ne reste pas constant au cours de la maladie.

Il s'agit du sens général d'une évolution qui englobe les processus de vieillissement biologique et physique du sérum mais qui ne peut être enfermé dans le cadre d'une expression mathématique.



SIXIÈME PARTIE

CONCLUSIONS



CHAPITRE I

RÉSUMÉ ET RAPPEL DE CONCLUSIONS

Les propriétés et les activités primordiales de la matière vivante ont pour support des substances de nature protéidique. Il est exceptionnel que celles-ci puissent être considérées comme des espèces chimiques ; des différentes fractions de protéides isolées du sérum sanguin, aucune n'en a les caractères (SORENSEN). Les principes immédiats biologiques, pour la plupart, n'existent pas à l'état libre dans les tissus animaux ou végétaux. Les procédés physiques de fractionnement nous livrent des édifices moléculaires beaucoup plus complexes formés par l'union de plusieurs principes immédiats avec des substances organiques et minérales, en particulier avec l'eau (MOLLIARD, NICLOUX, AMBARD).

Ce sont de véritables systèmes physico-chimiques dont l'évolution incessante, liée à leur état colloïdal, est d'une généralité plus grande (vieillessement du sérum *in vitro*) que les processus vitaux. Ils présentent des domaines de stabilité et de labilité qu'il importe de bien connaître.

Dans le sérum sanguin, lipides et protéides sont unis en des systèmes plus complexes auxquels MACHEBŒUF a donné le nom de *cénapses*.

L'union des lipides avec les protéides est très stable : elle résiste pendant très longtemps (plusieurs mois) à l'action de l'éther (MACHEBŒUF et WAHL), à la digestion peptique (SANDOR et DELAGE), à l'hydrolyse acide et alcaline à froid (DELAGE). Leur séparation totale exige une action très énergique (épuisement prolongé par l'alcool bouillant puis par

l'éther bouillant). Les lipides, qui sont en solution limpide dans le sérum, sont entraînés avec les protéides au cours de leur précipitation par certains sels.

Une telle cohésion n'existe pas entre les différents protéides constitutifs du sérum. On peut les fractionner avec une extrême facilité par précipitation saline, par hydrolyse acide ou alcaline et même par simple dilution. Les lipides restent toujours liés aux fractions protéidiques ainsi créées.

Le comportement des lipides vis-à-vis des protéides, cependant, n'est pas uniforme. L'éther additionné de petites quantités d'alcool, réactif doux et progressif, permet d'étudier la stabilité des liaisons qui unissent ces principes immédiats dans le sérum. MACHEBŒUF et SANDOR ont montré ainsi que la quantité de lipides extraite, d'abord très faible comme celle que l'on obtient avec l'éther seul, croît brusquement, lorsque la concentration alcoolique atteint une certaine valeur, jusqu'à un maximum en plateau, puis décroît. Les protéides partiellement délipidés ne sont pas dénaturés. Ils ont conservé leurs propriétés physiques essentielles, solubilité, précipitabilité réversible par le sulfate d'ammonium, point isoélectrique. De plus on peut faire jouer en sens inverse la concentration alcoolique et le temps de contact entre sérum et éther ; le maximum d'extraction reste le même.

Une différence physico-chimique doit donc exister entre les lipides extractibles et ceux qui ne le sont pas.

Pour répondre à cette question, il fallait connaître le rôle particulier de l'alcool éthylique ajouté au système (sérum + éther). Nous avons pour cela substitué à ce réactif toute une série de substances organiques et minérales et constaté qu'elles peuvent se répartir en deux groupes bien distincts :

1^o — Dans le premier groupe se placent des composés (les cinq premiers alcools acycliques primaires, le cyclohexanol, l'acétone) dont l'action est comparable à celle de l'éthanol.

Dès que la concentration de chacune d'elles dans le mélange (sérum + éther) dépasse une certaine valeur, il y a déclenchement du phénomène d'extraction. *Cette concentration*

critique ne dépend pas du poids moléculaire mais seulement de la nature de la substance. Le plateau de la courbe d'extraction, au contraire, est le même pour toutes les substances ; il est donc indépendant de la constitution de celles-ci et caractérise uniquement le sérum considéré.

Ainsi la quantité de lipides extraite par l'éther faiblement alcoolisé passe par un maximum et décroît ensuite lorsque la concentration alcoolique augmente. Ce maximum reste inchangé si l'on fait varier en sens inverse, entre certaines limites, la concentration alcoolique et le temps. Il est le même avec toute une série de composés chimiques assez différents. Ce maximum délimite donc une catégorie de substances lipodiques qui contractent avec les protéides des liaisons tout à fait particulières.

Nous avons proposé d'appeler *rapport d'extraction* le rapport entre le maximum de lipides extraits à froid par l'éther alcoolisé et les lipides totaux obtenus par épuisement alcoolique et éthéré du coagulum lipoprotéidique.

2° — Le second groupe comprend des composés (glycol éthylénique, aldéhydes formique et éthylique, acide sulfurique et soude en solution normale) qui n'ont aucun effet sur l'extraction. Les quantités de lipides extraites sont les mêmes qu'en présence d'éther seul.

Le phénomène est donc régi par une loi de «) Tout ou rien. » Pour les substances du premier groupe, l'extraction s'effectue jusqu'à un terme qui est le même pour toutes ; l'action des substances du deuxième groupe est absolument nulle.

Nous nous sommes alors demandés quelles différences déterminaient parmi les substances étudiées deux classes aussi nettement tranchées.

L'étude physico-chimique des systèmes (eau-éther-substance) puis (sérum-éther-substance) a établi que les substances du premier groupe sont solubles dans l'éther et diminuent notablement la tension interfaciale sérum-éther. Leur solubilité dans le sérum et leur action sur la solubilité de l'éther dans la phase aqueuse n'interviennent pas. Les substances du deuxième groupe sont insolubles ou peu solubles dans l'éther

et leur action dépressive sur l'énergie libre à l'interface sérum-éther est faible.

Il est possible de libérer certaines substances lipoïdiques du sérum par l'oléate de soude (CHARONNAT). MACHE-BŒUF et TAYEAU pensent que la chaîne polyméthylénique de ce sel s'est solvatée sur les groupements éleïques des protéïdes à la place des lipides qui ont été ainsi libérés.

Nous nous sommes attachés à préciser les conditions dans lesquelles doit se trouver le système (sérum-éther-alcool) pour que la valeur du rapport d'extraction soit toujours identique à elle-même.

1° — *Température.* La température moyenne doit être de 20° (pratiquement 17° à 23°). L'extractibilité des lipides diminue en effet avec ce facteur.

2° — *Concentration en ions hydrogène.* L'extractibilité des lipides varie considérablement avec le pH mais peut être considérée comme constante entre 7.0 et 8.5. Le pH du sérum est toujours compris entre ces limites, même dans les cas pathologiques.

3° — *Vieillessement du sérum.* On doit déterminer le rapport d'extraction en utilisant le sérum frais. Après un certain temps de conservation *in vitro* (un à trois mois) l'extractibilité des lipides sériques subit une diminution brusque et très importante.

Les différences physico-chimiques qui existent entre lipides extractibles et lipides non extractibles justifient suffisamment l'intérêt que nous attachons au rapport d'extraction.

Ce paramètre est très constant chez un animal donné même soumis à des saignées répétées, malgré les variations considérables des lipides totaux:

Sa valeur moyenne dans « l'état de santé » est de $\frac{2}{3}$ environ. Dans les états pathologiques graves, au contraire, le rapport d'extraction subit une chute considérable.

Chez la génisse, au cours de l'infection massive par le virus de la vaccine, il passe de la valeur moyenne 0.64 à la va-

leur moyenne 0.16 (soit une chute de 4 à 1) alors que les protéides totaux varient à peine et que les lipides totaux diminuent seulement dans le rapport de 1 à 0.55 (chiffres établis sur l'ensemble des 17 animaux utilisés).

L'étude de la néphrite expérimentale au nitrate d'urane et de la clavelée chez le mouton, de l'anémie infectieuse chez le cheval permet de confirmer la généralité du phénomène.

Chaque fois qu'un animal subit une atteinte sévère, le rapport d'extraction diminue considérablement. Cet accroissement de l'énergie de fixation des lipides aux protéides est la caractéristique d'un état pathologique grave. Il est indépendant de la lipidémie ; dans certains cas les lipides totaux augmentent, dans d'autres ils diminuent.

Les variations du rapport d'extraction sont très faibles dans les maladies bénignes (infection vaccinale localisée chez le lapin et la génisse, typhus expérimental de l'âne).

Au cours des états pathologiques, la constitution des lipides sériques subit aussi des variations qualitatives et quantitatives. L'hypolipidémie est de règle dans la maladie vaccinale, mais la diminution des substances insaponifiables (libres et combinées) est plus rapide que celle des acides gras totaux. Il faut noter également que *les substances lipoidiques extraites à froid au voisinage du maximum d'extraction sont plus riches en insaponifiable que celles qui restent liées aux protéides dans ces conditions.*

De grandes différences d'état physico-chimique existent entre les lipides du lait et du sérum, malgré une certaine analogie des courbes d'extraction. Nous pensons qu'il n'y a pas de cénapses lipoprotéidiques dans le lait. On peut cependant envisager l'existence d'un système lipidique autonome, construit sur le schéma des systèmes lipoprotéidiques, mais moins bien stabilisé vis-à-vis de l'eau par suite de l'insuffisance numérique des groupements polaires hydrophiles.

Cette hypothèse rend bien compte des faits mais doit être étayée par des recherches ultérieures.

Une analyse plus complète du phénomène d'extraction comportait l'examen comparatif de l'extractibilité des lipides

liés aux deux grands groupes de protéides que sépare le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Les recherches des auteurs qui avaient abordé ce problème portaient sur des protéides dénaturés par la chaleur ou la dessiccation. Nous avons pu établir que, *dans le système lipoglobulinique, l'union des lipides avec les protéides non dénaturés est beaucoup plus énergique que dans le système lipoalbuminique.*

Ces constatations permettent de coordonner et d'interpréter d'autres résultats : *la diminution concomitante du rapport d'extraction et de l'index albuminique au cours des états pathologiques.* L'extractibilité des lipides globuliniques étant beaucoup plus faible que celle des lipides albuminiques, l'augmentation des globulines par rapport aux albumines doit se traduire par la diminution du rapport d'extraction que l'on observe effectivement.

Le vieillissement du sérum est également marqué par une diminution de l'index albuminique et par une chute brusque du rapport d'extraction.

Nous avons montré que *le facteur concentration en ions hydrogène influe profondément sur l'extractibilité des lipides sériques.* Celle-ci, maxima au voisinage de la neutralité, diminue par acidification. Dans la zone alcaline, elle diminue également lorsque le pH dépasse la valeur 9, atteint très rapidement un minimum vers 10 et augmente à nouveau au-dessus de 12.

La diminution de l'extractibilité paraît être en rapport avec l'hydratation des micelles et l'accroissement de la zone aqueuse périmicellaire imperméable aux solvants des graisses, surtout du côté alcalin du point isoélectrique moyen des protéides sériques. Lorsque le milieu devient très alcalin, les forces électrostatiques dues à l'ionisation, qui tendent à déformer les micelles, arrivent finalement à les faire éclater. L'augmentation très rapide de la viscosité du sérum en milieu alcalin est une preuve du gonflement et de l'hydratation des micelles. Ces modifications de l'extractibilité sous l'influence du pH ne sont pas réversibles.

CHAPITRE II

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Comment peut-on concevoir le fonctionnement du système lipoprotéidique du sérum sanguin ?

Les lipides sériques peuvent être classés d'après l'énergie de leurs liaisons avec les protéides en trois catégories bien distinctes :

1° — Les lipides extractibles par l'éther pur ou alcoolisé à des taux inférieurs à la concentration critique.

Ils ne sont pas à l'état libre car le sérum est optiquement vide. Ils sont engagés, soit dans des cénapses lipoprotéidiques, soit dans des cénapses lipo-lipidiques. L'étude particulière de ces lipides, qui représentent 1 à 5 % des lipides totaux, n'a jamais été entreprise.

2° — Les lipides extractibles par l'éther pour la concentration optima en alcool (les lipides extraits par l'éther seul étant englobés dans cette catégorie).

Les cénapses, que l'extraction de ces lipides a partiellement délipidées, ont gardé leurs propriétés physiques essentielles et n'ont pas subi de dénaturation appréciable.

3° — Les lipides non extractibles par l'éther alcoolisé à froid. Leur libération exige la dénaturation complète des cénapses lipoprotéidiques (action prolongée de l'alcool puis de l'éther à l'ébullition).

La stabilité des lipides dans les cénapses lipoprotéidiques est mesurée par l'équilibre qui s'établit entre ces deux catégories de lipides. Nous avons montré l'intérêt qui s'attache à la connaissance de cet équilibre.

On peut dire avec beaucoup de certitude qu'une valeur du rapport d'extraction supérieure à 0.60 caractérise l'état de santé ; inférieure à 0.20 elle est un indice de maladie grave. Ces chiffres sont indépendants des variations souvent considérables de la lipidémie.

Le rapport d'extraction diminue également par conservation du sérum *in vitro*.

Aucune variation du pH compatible avec la vie ne peut expliquer cette diminution de l'extractibilité des lipides au cours des états pathologiques.

La définition des grandes fractions protéïdiques est basée sur l'existence d'une discontinuité de la courbe de précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. Les globulines sont précipitées par ce sel à demi saturation, les albumines à saturation complète. L'équilibre qui s'établit entre ces deux catégories de protéïdes est mesuré par l'index albuminique, rapport des albumines aux globulines. Celui-ci diminue dans tous les processus que nous avons réunis sous le terme de *vieillessement* (physiologique et physique) : âge, maladie, vieillissement *in vitro*, alcalinisation.

Des paliers thermodynamiques très nets permettent ainsi de définir plusieurs catégories de lipides et de protéïdes, mais il n'existe pas entre chacune d'elles de différence chimique qualitative appréciable.

Les lipides extractibles et non extractibles diffèrent un peu par leur teneur en acides gras, en insaponifiable, en phosphore, mais il n'y a aucune substance lipoïdique qui fasse partie exclusive de l'une de ces catégories. Quant aux albumines et aux globulines, ni leur composition élémentaire, ni leur teneur en acides aminés, ni leur index aminique ne constitue entre elles de différences bien nettes.

Il est certain que leurs propriétés physiques (solubilité, poids moléculaire, point isoionique) confèrent aux globulines et aux albumines une certaine individualité ; il faut ajouter que les lipides extractibles sont liés en majeure partie aux albumines et les lipides inextractibles aux globulines. Ce sont donc des systèmes physiques ; ils ne nous paraissent pas avoir une valeur chimique réelle.

Il est très important de noter que les paramètres qui définissent l'équilibre micellaire du système lipoprotéidique, le rapport d'extraction pour les lipides, l'index albuminique pour les protéides, ne sont pas indépendants. Ils varient dans le même sens sous l'influence du vieillissement physiologique et physique.

Le vieillissement se traduit donc par une diminution de l'extractibilité des lipides et une augmentation de la précipitabilité des protéides. Si l'on remarque de plus que le poids moléculaire des globulines est double de celui des albumines, on est conduit à penser que cette évolution lente, variable, mais irréversible que constitue le vieillissement se traduit dans le sérum par la transformation

Système lipoalbuminique —→ système lipoglobulinique.

Cette réaction, essentiellement quantique, se traduirait par la condensation de deux granules albuminiques en un granule globulinique, les lipides albuminiques extractibles devenant des lipides globuliniques inextractibles.

Ce schéma mécanique un peu succinct rend compte des variations souvent très rapides du rapport d'extraction et de l'index albuminique. Nous ne savons malheureusement pas si le changement de précipitabilité des protéides s'accompagne toujours d'une transformation chimique réelle.

Un fait demeure certain : l'évolution des protéides est inséparable de celle des lipides et l'état physiologique de l'organisme dépend essentiellement d'un équilibre entre les différentes catégories de lipides et de protéides que nous avons énumérées. Cet équilibre est mesuré par l'index albuminique et le rapport d'extraction.

Le système lipoprotéidique du sérum, avec son double caractère de stabilité et de mobilité apparaît donc comme essentiellement représentatif des activités de la matière vivante.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

TECHNIQUES

Pages

CHAPITRE I. — GENERALITES SUR LA PREPARATION DU SERUM	7
Rapports du sérum avec le sang	7
Mode d'obtention du sérum	8
Conditions de prélèvement du sang	9
Technique employée pour la préparation du sérum	10
Enoncé de quelques résultats	10
CHAPITRE II. — METHODES ANALYTIQUES	13
Dosage de l'urée (Technique personnelle)	14
Dosage du phosphore	16
A. Phosphore total	16
B. Phosphore lipoidique	17
Dosage des lipides	18
A. Extrait lipoidique total	18
B. Insaponifiable et acides gras totaux	19
Dosage des protéides	21
A. Protéides totaux	21
B. Globulines et albumines	23

DEUXIEME PARTIE

EXPOSE HISTORIQUE ET CRITIQUE DU PROBLEME DES PROTEIDES

CHAPITRE I. — LES PROTEIDES SERIQUES	29
Recherches analytiques sur les protéides du sérum	30
Fractionnement	30
Caractères physiques des protéides	31
Propriétés électro-chimiques des protéides.....	32
Poids moléculaire	34
Caractères chimiques des protéides	36
Analyse élémentaire	36
Analyse des acides aminés obtenus à l'hydrolyse	36
Index aminique	37
Recherches analytiques sur les globulines et les albumines	37
Fractionnement des globulines	37
Fractionnement des albumines	38
Autres travaux sur le fractionnement des protéides sériques	38
CHAPITRE II. — PREMIERE DISCUSSION SUR LA NATURE DES PROTEIDES SERIQUES ET LEURS RELATIONS RECIPROQUES	42
CHAPITRE III. — RELATIONS DES LIPIDES AVEC LES PROTEIDES. LES GENAPSES	51
Généralités sur l'état des lipides dans la matière vivante	51
Travaux de chimie physiologique	51
Travaux d'histologie et de cytologie	52
Théorie des lipides vivants	53
Les lipoprotéides artificiels	53
Les lipides du sérum sanguin	54
Phosphore des protéides	55
Séparation quantitative des substances lipoidiques	56
Extraction des lipides du sérum à basse température ...	57
Etude des liaisons lipides-protéides	57
Travaux de M. MACHEBOEUF	60
Recherches sur la nature et la stabilité des liaisons lipides- protéides dans le sérum sanguin	65
CHAPITRE IV. — SUR LA NATURE DES FORCES QUI INTERVIENNENT DANS LA CONSTITUTION DE LA MATIERE VIVANTE	73

TROISIEME PARTIE

LA STABILITE DU SYSTEME LIPOPROTEIDIQUE DU SERUM

CHAPITRE I. — INFLUENCE DE DIFFERENTES SUBSTANCES SUR L'EXTRACTIBILITE DES LIPIDES SERIQUES	83
Technique	85
Substances étudiées	86
I. Substances favorisant l'extraction des lipides par l'éther	89
II. Substances ne favorisant pas l'extraction des lipides par l'éther	92
Acide sulfurique et soude en solution normale	95
Conclusions	98
Autres recherches sur l'extractibilité des lipides sériques	99
CHAPITRE II. — ANALYSE DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EXTRACTIBILITE DES LIPIDES SERIQUES	101
Examen de la 1^{re} hypothèse : Solubilité de l'éther dans le sérum en présence des différentes substances étudiées	103
Essais faits avec l'eau	104
Essais faits avec le sérum	107
Examen de la 2^e hypothèse : Modification de la nature du solvant par suite de la dissolution dans l'éther de certaines substances	108
Essais faits avec l'eau	108
Essais faits avec le sérum	111
Examen de la 3^e hypothèse : Diminution des forces capillaires au niveau de la micelle lipoprotéidique	111
Essais faits avec l'eau	111
Essais faits avec le sérum	113
Conclusions	114
Hypothèse basée sur la libération des lipides du sérum par un savon	115
CHAPITRE III. — INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU pH SUR L'EXTRACTIBILITE DES LIPIDES SERIQUES	117
I. Température	117
II. Concentration en ions hydrogène	121
Technique	121
Résultats	121
Essai d'interprétation des faits	124
Conclusions	127

QUATRIÈME PARTIE

**LE SYSTEME LIPOPROTEIDIQUE DU SERUM DANS LES ETATS
PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES**

CHAPITRE I. — LE RAPPORT D'EXTRACTION. ETUDE DE CE PARAMETRE CHEZ L'ANIMAL SAIN	131
Influence des saignées espacées chez l'animal sain	132
Influence des saignées répétées chez l'animal sain	134
Conditions de prélèvement du sérum	134
Conclusions	137
CHAPITRE II. — MALADIE VACCINALE	139
I. Le système lipoprotéidique du sérum au cours de l'infection vac- cinale massive	140
Technique expérimentale	140
Evolution des lipides	144
I. Métabolisme des lipides	144
II. Variations du rapport d'extraction	143
III. Comparaison des lipides extraits à froid aux lipides totaux	150
Evolution des protéides	152
I. Protéides totaux	152
II. Index albuminique	153
Evolution d'autres constantes chimiques et physiques	154
I. Urée	154
II. Chlore	155
III. Point cryoscopique	156
Conclusions	156
II. Le système lipoprotéidique du sérum au cours de l'infection vac- cinale localisée	157
Génisse	157
Lapin	158
Travaux de M. COPPO et de ses collaborateurs	158
Travaux personnels	160

CAPITRE III. — ANEMIE INFECTIEUSE ET TRYPANOSOMIASES	163
Recherches antérieures	163
Recherches personnelles	164
Observations sur les cas examinés	164
Examen critique des résultats expérimentaux	168
Conclusions	170
CAPITRE IV. — NEPHRITE EXPERIMENTALE URANIQUE	171
Evolution des lipides au cours de la maladie	174
I. Variation du taux des lipides	174
II. Rapport d'extraction	174
III. Phosphore	175
Conclusions	177
CAPITRE V. — ETUDE SOMMAIRE D'AUTRES MALADIES	179
I. Clavelée chez le mouton	179
II. Typhus expérimental chez l'âne	180
III. Néphrose lipoidique chez l'homme	180
Conclusions	181
CAPITRE VI. — LE VIEILLISSEMENT DU SERUM	183
Description du phénomène	184
I. Mode opératoire	184
II. Résultats généraux	184
III. Chiffres expérimentaux	184
IV. Evolution du phénomène	188
Autres phénomènes observés au cours du vieillissement	189
Conclusions	190
Application des propriétés du sérum vieilli	191
Vérification indirecte de notre hypothèse sur les relations entre la tension interfaciale et l'extractibilité	191

CINQUIEME PARTIE

ESSAIS DE GENERALISATION ET D'INTERPRETATION DES FAITS

CHAPITRE I. — ETUDE SOMMAIRE DE L'ETAT DES LIPIDES DANS LE LAIT	197
Technique	197
Résultats	198
Conclusions	200
CHAPITRE II. — EXTRACTIBILITE COMPAREE DES LIPIDES LIES AUX GLOBULINES ET AUX ALBUMINES DU SERUM SANGUIN	201
Recherches antérieures	201
Recherches personnelles	202
Mode opératoire	203
Résultats obtenus	205
Conclusions	208
CHAPITRE III. — DEUXIEME DISCUSSION SUR LA NATURE DES PROTEIDES SERIQUES, LEURS RAPPORTS AVEC LES LIPIDES	211

SIXIEME PARTIE

CONCLUSIONS

CHAPITRE I. — RESUME ET RAPPEL DE CONCLUSIONS	217
CHAPITRE II. — CONCLUSIONS GENERALES	223

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Les protéines-virus

Vu et approuvé :

Paris, le 26 Novembre 1938

**Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Ch. MAURAIN**

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris**

G. ROUSSY

Propositions données par la Faculté

Les professeurs-vices

Le 10 Mars 1904
Le 10 Mars 1904
Le 10 Mars 1904
Le 10 Mars 1904

Le 10 Mars 1904
Le 10 Mars 1904
Le 10 Mars 1904
Le 10 Mars 1904

